

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DINIARA SOARES

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS
DE MICROALGAS MARINHAS EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO**

CURITIBA

2010

DINIARA SOARES

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS
DE MICROALGAS MARINHAS EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Co-orientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Júnior

CURITIBA

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

DINIARA SOARES

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE MICROALGAS MARINHAS EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. David Alexander Mitchell (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Guilherme Lanz Sassaki
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr. André Bellin Mariano
Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável – UFPR



Dr. Bill Jorge Costa
Centro Brasileiro de Referência em Biocombustíveis – TECPAR

Curitiba, 29 de Janeiro de 2010.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Ubaldino R. Soares e Terezinha P. Soares
e ao meu marido Alan Guilherme Gonçalves.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e companheiro Alan, pelo constante estímulo, paciência e ajuda durante a realização deste trabalho e especialmente pelo amor e alegria durante todos os momentos compartilhados.

À minha grande família, especialmente aos meus pais Ubaldino e Terezinha, e aos meus irmãos, Jussara, Juciara, Jucélia, Juliana e Ubaldino Filho, por simplesmente fazerem parte da minha vida e formação, e por me apoiarem sempre que precisei. À memória de Iara, que descanse em paz.

Ao meu orientador David Alexander Mitchell pela orientação, amizade, paciência e por confiar em mim, me dando liberdade e estímulo em todas as minhas decisões.

Aos professores co-orientadores, Miguel Daniel Nosedá e Luiz Fernando de Lima Luz Júnior pelas orientações durante meu trabalho, apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório, Graciele, Daiane, Wellington, Carol e Kelli, pela amizade e dicas de trabalho.

À todos os funcionários do departamento de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, em especial a Dona Marilza e Valter pelos favores prestados.

À UFPR e ao departamento de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste mestrado. Em especial aos laboratórios de fermentações, carboidratos e oxidações, pela disponibilidade dos laboratórios.

Ao NPDEAS em especial ao professor José Viriato Coelho Vargas, que criou a oportunidade desta linha de pesquisa na UFPR. Ao amigo André pelo incentivo, amizade e dedicação. Aos alunos e estagiários Alexandre Stall, Vilson, Guilherme, Dayane, Cassiana e a todos que contribuíram com este trabalho.

Ao GIA, em especial ao professor Antônio Ostrenski pela disponibilidade das cepas e cultivos das microalgas utilizadas neste trabalho. Ao Alexandre Becker, pela amizade, disponibilidade e auxílio em tudo que precisei durante os meus cultivos no GIA. Aos estagiários, Roberta, Gabriel, Pedro e Caio pelo esforço, dedicação e auxílio nos meus experimentos.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química, em especial às professoras Sônia Faria Zawadzki, Regina Weinschutz e aos professores Luiz Fernando, Moacir Kaminski e Tadeu pelo apoio e incentivo desde a graduação.

Às minhas grandes amigas, Lorena, Rafaela, Vanessa, Carla e Andressa, pela amizade, lealdade, momentos de descontração e por me ajudarem sempre que precisei.

Aos membros da Banca Examinadora, Bill Jorge Costa, André Bellin Mariano e Guilherme Lanzi Sasaki pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento desta dissertação.

À CAPES, CNPq e Nilko, pelo auxílio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

“Vencer a si próprio é a maior de todas as vitórias.”

Platão

RESUMO

A avaliação de espécies de microalgas, assim como a introdução de eficientes regimes de cultivo, meios de recuperação de biomassa e extração de lipídeos são necessários para viabilizar o uso destes organismos na produção de lipídeos como fonte de biocombustível. Neste trabalho foram primeiramente avaliadas diferentes metodologias de extração de lipídeos utilizando duas espécies de microalgas: *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*. Para isso foram realizadas diferentes adaptações do método de Folch et al. e do método de Bligh e Dyer, os quais são baseados no uso de uma mistura monofásica de clorofórmio, metanol e água. Esta avaliação indicou a metodologia de Bligh e Dyer adaptada como a mais eficiente e levou a seleção da microalga *P. tricornutum* para as etapas seguintes deste trabalho. Os efeitos do uso de agentes flocculantes (NaOH e FeCl₃) e soluções de lavagem (NaCl, NH₄HCO₃ e H₂O) na recuperação de biomassa e teor lipídico foram então avaliados. Neste caso, o teor lipídico não foi afetado significativamente pelos processos testados. Levando em consideração simplicidade e baixo custo, foram selecionados o uso do flocculante NaOH e da não utilização de solução de lavagem como processo geral de obtenção de biomassa. Como etapa final deste trabalho, foram avaliadas três diferentes maneiras de se cultivar a microalga *P. tricornutum*: cultivo em minifotobiorreator, cultivos em erlenmeyers de 2L (em regime de batelada e semicontínuo). Para o cultivo em minifotobiorreator, foram realizadas tentativas de cultivo e otimização do sistema e avaliação do efeito do bombeamento nas células. Neste caso não foram alcançadas condições definitivas para utilização deste sistema. Já o cultivo em regime de batelada foi avaliado em relação à concentração inicial de inóculo e fotoperíodo. As melhores condições encontradas foram então aplicadas a um regime de cultivo semicontínuo. De acordo com a comparação dos resultados obtidos, as condições de cultivo definidas neste trabalho foram regime semicontínuo, fotoperíodo de 24 h, concentração de inóculo na faixa de 30×10^4 até 50×10^4 cél.mL⁻¹ e taxa de diluição de 0,014 h⁻¹.

Palavras-chave: microalga, biodiesel, *Phaeodactylum tricornutum*, cultivo, floculação

ABSTRACT

Evaluation of microalgae species as well as the introduction of efficient culture systems, biomass recovering and lipid extraction are necessary for the utilization of these organisms as biofuel source. In this work, we have first evaluated different lipid extraction methodologies on two microalgae species: *Nannochloropsis oculata* and *Phaeodactylum tricornutum*. Different adaptations from Folch *et al.* and Bligh and Dyer methods, which are based on a monophasic mixture of chloroform, methanol and water were tested for lipid extraction. This evaluation indicated the adapted Bligh and Dyer conditions as the most suitable method and led us to select *P. tricornutum* for the next steps of this work. The effect of the use of flocculant agents (NaOH and FeCl₃) and washing solutions (NaCl, NH₄HCO₃ and H₂O) on biomass and lipid content were also evaluated. In this case, the lipid content was not affected by the process utilized. Considering simplicity and low cost, we selected NaOH solution as flocculant and we chose to not utilize any washing step after biomass recovering. We also evaluated three different ways of culturing *P. tricornutum*: miniphotobioreactor culturing and two types of 2 L erlenmeyer culturing (batch and semicontinuous system). For miniphotobioreactor, culturing attempts and pumping effects were studied; however, definitive culture conditions could not be established. Batch cultures were evaluated in terms of initial cell density and photoperiod. Selected conditions were then applied for semicontinuous system. The overall results indicated that the best culturing conditions were semicontinuous system, 24 h photoperiod, 30×10^4 to 50×10^4 cel.mL⁻¹ initial cell density and 0.014 h⁻¹ renewal rate.

Keywords: microalgae, biodiesel, *Phaeodactylum tricornutum*, cultivation, flocculation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS...	23
FIGURA 2	- EXEMPLOS DE CULTIVOS EM PEQUENA ESCALA; (A) CEPÁRIO; (B) CULTIVOS EXPERIMENTAIS EM ERLLENMEYERS E BOMBONAS; (C) CULTIVO EM SACOS DE POLIETILENO	26
FIGURA 3	- CULTIVO DE MICROALGAS EM TANQUES; (A) PRODUÇÃO DE <i>Nannochloropsis oculata</i> EM AMBIENTE FECHADO NO GIA (UFPR); (B) PRODUÇÃO DE <i>Spirulina sp.</i> NA CALIFÓRNIA (EUA); (C) PRODUÇÃO DE <i>Spirulina sp.</i> E <i>Haematococcus pluvialis</i> NO HAWAII (EUA)	28
FIGURA 4	- CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREATORES; (A) PRODUÇÃO DE <i>Chlorella</i> EM FOTOBIORREATOR EM CASA DE VEGETAÇÃO NA ALEMANHA; (B) CULTIVO EM FOTOBIORREATOR INDUSTRIAL AO AR LIVRE EM ISRAEL; (C) CULTIVO EXPERIMENTAL EM FOTOBIORREATOR NO MIT.....	30
FIGURA 5	- TANQUES DE CULTIVO DE MICROALGAS MARINHAS A BEIRA MAR; (A) PRODUÇÃO DE <i>Dunaliella salina</i> NA AUSTRÁLIA; (B) PRODUÇÃO DE <i>Nannochloropsis oculata</i> NO HAWAII	32
FIGURA 6	- CÉLULAS DA MICROALGA <i>Nannochloropsis oculata</i>	44
FIGURA 7	- CÉLULAS DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	46
FIGURA 8	- FLUXOGRAMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO	49
FIGURA 9	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROPAGAÇÃO DE CULTIVOS	52
FIGURA 10	- MINIFOTOBIORREATOR EXPERIMENTAL	56
FIGURA 11	- MODELOS DE BOMBA DE MOVIMENTAÇÃO. (B1) BOMBA CENTRÍFUGA SCHNEIDER; (B2) BOMBA CENTRÍFUGA DANCOR; (B3) ELETROBOMBA DE CIRCULAÇÃO	57
FIGURA 12	- CULTIVO EM TANQUES DE FIBRA PARA TESTE DE BOMBEAMENTO DO MEIO DE CULTURA COM BOMBA CENTRÍFUGA (B2)	58
FIGURA 13	- CURVA DE CRESCIMENTO DAS MICROALGAS <i>Nannochloropsis oculata</i> (A) E <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (B), MOSTRANDO OS AJUSTES DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (—) E EXPONENCIAL (- - -) AOS DADOS (•)	67
FIGURA 14	- RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA (A) E LIPÍDEOS (B) DA MICROALGA <i>P. tricornutum</i> EM QUATRO TRATAMENTOS DIFERENTES DE LAVAGEM DA BIOMASSA ÚMIDA.....	71
FIGURA 15	- RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA (A) E LIPÍDEOS (B) DA MICROALGA <i>P. tricornutum</i> EM TRÊS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DIFERENTES	74

FIGURA 16	- CULTIVO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM MINIFOTOBIOREATOR COM BOMBA CENTRÍFUGA B1 (SCHENEIDER). (A) DENSIDADE CELULAR, (B) CONDIÇÕES CLIMÁTICAS	77
FIGURA 17	- CULTIVO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM MINIFOTOBIOREATOR COM BOMBA CENTRÍFUGA B2 (DANCOR). (A) DENSIDADE CELULAR; (B) CONDIÇÕES CLIMÁTICAS	79
FIGURA 18	- ASPECTO DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CULTIVADA EM MINIFOTOBIOREATOR COM BOMBA CENTRÍFUGA B2	79
FIGURA 19	- CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA (CONTROLE) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO	80
FIGURA 20	- EFEITO DO BOMBEAMENTO DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> NA PRODUÇÃO DE CÉLULAS EM TANQUES	82
FIGURA 21	- CULTIVO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM MINIFOTOBIOREATOR COM ELETROBOMBA B3. (A) DENSIDADE CELULAR; (B) CONDIÇÕES CLIMÁTICAS; (C) pH.	85
FIGURA 22	- ASPECTO DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> APÓS SETE DIAS DE CULTIVO	86
FIGURA 23	- ASPECTOS DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA <i>P. tricornutum</i> A PARTIR DE DIFERENTES DENSIDADES CELULARES INICIAIS	88
FIGURA 24	- PRODUÇÃO DE CÉLULAS DA MICROALGA <i>P. tricornutum</i> A PARTIR DE DIFERENTES DENSIDADES CELULARES INICIAIS.....	89
FIGURA 25	- COMPARAÇÃO ENTRE AS DENSIDADES CELULARES MÁXIMAS OBTIDAS EM DIFERENTES DENSIDADES CELULARES INICIAIS.....	89
FIGURA 26	- PRODUÇÃO DE CÉLULAS DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM DIFERENTES FOTOPERÍODOS.....	91
FIGURA 27	- PRODUÇÃO DE CÉLULAS DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM REGIME DE BATELADA E SEMICONTÍNUO UTILIZANDO DILUIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE 10% (A), 20% (B) E 30% (C).....	94
FIGURA 28	- CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CULTIVADA EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO.....	95
FIGURA 29	- CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CULTIVADA EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS (%) DE ÓLEOS VEGETAIS E DE MICROALGAS MARINHAS.....	24
TABELA 2	- COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE CULTIVOS DE MICROALGAS ABERTO (LAGOA) E FECHADO (FOTOBIORREATOR).....	31
TABELA 3	- CULTIVOS AUTOTRÓFICOS REALIZADOS COM <i>Nannochloropsis oculata</i>	45
TABELA 4	- CULTIVOS AUTOTRÓFICOS REALIZADOS COM <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	47
TABELA 5	- COMPOSIÇÃO DO MEIO GUILLARD F/2 MODIFICADO.....	51
TABELA 6	- ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DAS MICROALGAS <i>Nannochloropsis oculata</i> E <i>Phaeodactylum tricornutum</i> PELO AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA.....	68
TABELA 7	- PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DAS MICROALGAS <i>Nannochloropsis oculata</i> E <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	69
TABELA 8	- TEOR TOTAL DE LIPÍDEOS (EM % DE BIOMASSA SECA) DAS MICROALGAS <i>Nannochloropsis oculata</i> E <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EXTRAÍDOS POR DIFERENTES METODOLOGIAS..	75
TABELA 9	- MODIFICAÇÕES SUGERIDAS PARA EXPERIMENTOS FUTUROS NO MINIFOTOBIORREATOR APÓS DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	86
TABELA 10	- PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CULTIVADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO.....	90
TABELA 11	- ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CULTIVADA COM DIFERENTES FOTOPERÍODOS.....	91
TABELA 12	- PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CULTIVADA COM DIFERENTES FOTOPERÍODOS.....	92
TABELA 13	- PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM REGIME DE BATELADA.....	96
TABELA 14	- PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DURANTE O ESTADO PSEUDOESTACIONÁRIO DO CULTIVO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM REGIME SEMICONTÍNUO.....	97

LISTA DE SIGLAS

AGMI	- Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	- Ácidos graxos poliinsaturados
AGS	- Ácidos graxos saturados
ANP	- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ARA	- Ácido graxo araquidônico
BEAM	- Biotechnological and Environmental Applications of Microalgae
CMEA	- Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DHA	- Ácido graxo docosahexanóico
EPA	- Ácido graxo eicosapentanóico
EPE	- Empresa de Pesquisa Energética
EUA	- Estados Unidos da América
GIA	- Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais
LMH	- Laboratório de Máquinas Hidráulicas
MA	- Massachussetts
MCT	- Ministério da Ciência e Tecnologia
MDL	- Mecanismo de Desenvolvimento Limpo
MIT	- Massachussetts Institute of Technology
MME	- Ministério de Minas e Energia
NPDEAS	- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Auto-Sustentável
ÖPA	- Ökologische Produkte Altmark
PAR	- Photosynthetically Active Irradiance
PNPB	- Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
UFF	- Universidade Federal Fluminense
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- por cento
n.	- número
°C	- graus Celsius
B100	- Biodiesel puro
BX	- BX é uma mistura biodiesel / diesel, onde X é a percentagem em volume do biodiesel
NO _x	- óxidos de nitrogênio
d	- dia
C:N	- razão atômica de carbono:nitrogênio
n-3	- ômega 3
n-6	- ômega 6
Re	- número de Reynolds
ρ	- densidade
D _t	- diâmetro do tubo
η	- viscosidade
Pa	- Pascal
T	- temperatura
FP	- fotoperíodo
nc	- não consta
CC	- exposto a condições climáticas
kgf	- quilograma força
‰	- partes por mil
PVC	- policloreto de vinila
CV	- Cavalo Vapor (unidade de potência)
N	- densidade celular (células.mL ⁻¹)
N ₀	- densidade celular inicial (células.mL ⁻¹)
N _{máx}	- densidade celular máxima (células.mL ⁻¹)
(e) exp	- exponencial
μ	- velocidade específica de crescimento
t	- tempo
rpm	- rotações por minuto
g	- aceleração da gravidade na superfície da terra
B _L	- biomassa liofilizada (seca) por litro de cultura microalgal
P _B	- produtividade de biomassa seca por litro de meio de cultura por dia
B ₀	- quantidade de biomassa inicial
B _i	- quantidade de biomassa no tempo i
v/v	- volume por volume
L _B	- lipídeos totais (em % de biomassa liofilizada)

L_C	- lipídeos totais (em mg por litro de cultura microalgal)
P_L	- produtividade de lipídeo por litro de meio de cultura por dia
L_{co}	- quantidade de lipídeo inicial
L_{ci}	- quantidade de lipídeo no tempo i
S	- erro padrão da amostra
n	- número de amostras
N_p	- número de passagens (pela bomba centrífuga)
Q	- vazão volumétrica
$DC_{máx}$	- dia do cultivo em que foi alcançada densidade celular máxima
DC_{sc}	- taxa de diluição média no regime semicontínuo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 BIODIESEL	20
2.1.1 Matérias-primas para produção de biodiesel	21
2.1.2 Tecnologias para produção de biodiesel	21
2.2 MICROALGAS COMO FONTE DE BIODIESEL	23
2.3 PRODUÇÃO DE MICROALGAS	26
2.3.1 Cultivo em tanques	27
2.3.2 Cultivo em fotobiorreatores	28
2.3.3 Meios de cultivo para microalgas	31
2.3.4 Regimes de cultivo de microalgas	32
2.3.4.1 Cultivo em batelada	33
2.3.4.2 Cultivo semicontínuo	34
2.3.4.3 Cultivo contínuo	35
2.4 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS	35
2.5 FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DE MICROALGAS	37
2.5.1 Temperatura	37
2.5.2 Luz	38
2.5.3 Mistura, aeração e bombeamento	40
2.5.4 Limitação de nutrientes	42
2.6 MICROALGAS	43
2.6.1 Microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	43
2.6.2 Microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	46
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 MICROALGAS	50
4.2 MEIO DE CULTIVO	50
4.2.1 Propagação dos cultivos	51
4.3 CULTIVOS EM ERLLENMEYERS	52
4.3.1 Condições de cultivo	52
4.3.2 Cultivo em regime de batelada	53
4.3.2.1 Cultivos preparados para caracterizar a cinética de crescimento	53
4.3.2.2 Cultivos preparados para verificar o efeito da concentração inicial de inóculo	53
4.3.2.3 Cultivos preparados para verificar o efeito do fotoperíodo	54
4.3.3 Cultivo em regime semicontínuo	54
4.4 CULTIVOS EM MINIFOTOBIOREATOR	55
4.4.1 Teste com bomba centrífuga	57
4.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	58
4.5.1 Cinética de crescimento	58
4.6 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA	59
4.6.1 Centrifugação	59
4.6.2 Lavagem da biomassa	60
4.6.3 Floculação	61
4.6.3.1 Floculação com solução de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,3 M	61
4.6.3.2 Floculação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M	61

4.7 LIPÍDEOS TOTAIS.....	61
4.7.1 Metodologia adaptada de Bligh e Dyer (1959)	62
4.7.2 Método de Folch et al. (1957).....	63
4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 AVALIAÇÃO DAS MICROALGAS <i>Nannochloropsis oculata</i> E <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	65
5.1.1 Caracterização da cinética de crescimento	66
5.1.2 Produtividade de biomassa e lipídeos	68
5.2 AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS	69
5.2.1 Recuperação da biomassa	69
5.2.1.1 Efeito do tratamento de lavagem da biomassa úmida na recuperação de biomassa e lipídeos de microalgas.....	70
5.2.1.2 Efeito da floculação da cultura na recuperação de biomassa e lipídeos de microalgas	72
5.2.2 Extração de lipídeos totais.....	74
5.3 CULTIVO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM MINIFOTOBIOREATOR.....	75
5.4 CULTIVO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM REGIME DE BATELADA.....	87
5.4.1 Cultivo da microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i> em diferentes densidades celulares iniciais de inóculo.....	87
5.4.2 Cultivo da microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i> em diferentes fotoperíodos	90
5.5 CULTIVO DA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM REGIME SEMICONTÍNUO.....	92
6 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

O constante crescimento econômico do Brasil acelera o desenvolvimento das indústrias, que conseqüentemente aumentam o consumo de combustível. Segundo resultados do Balanço Energético Nacional de 2008, o petróleo e seus derivados atingiram 36,7% de participação na matriz energética nacional, mas as reservas de combustíveis fósseis são finitas e não-renováveis (EPE, 2009).

Como complemento dos combustíveis não-renováveis, os biocombustíveis surgem como fonte de energia renovável. A volatilidade do custo do barril de petróleo e a crescente preocupação com questões ambientais, como a redução das emissões de gases do efeito estufa, são os principais motivos para apoiar a produção e utilização dos biocombustíveis. Pelo fato de o biodiesel ser uma fonte de energia renovável e possuir características vantajosas em relação aos combustíveis fósseis, os governos mundiais estão apoiando programas de pesquisa, reduções e isenções fiscais para a produção industrial de matérias-primas para produção de biodiesel (PNPB, 2009).

Atualmente, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) abriu vários editais na área de biodiesel. O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável (NPDEAS) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) foi criado a partir de um dos projetos aprovados pelo CNPq (Edital MCT/CNPq/CTAgro/CTBio 39/2007). Este projeto tem como propósito construir um prédio auto-sustentável em energia elétrica a partir de biodiesel produzido do óleo extraído de microalgas cultivadas em fotobiorreatores tubulares horizontais construídos de forma modular e compacta. Em 2008, o NPDEAS ganhou outro projeto do CNPq, específico para a produção de biodiesel a partir de microalgas (Edital MCT/CNPq/SEAP-PR 26/2008), para complementação do projeto anterior. O interesse em microalgas se deve ao fato do potencial de proporcionar uma produtividade (litros de óleo produzidos por hectare por ano) dez vezes mais alta do que o que pode ter uma planta oleaginosa de boa produtividade (CHISTI, 2007).

O presente trabalho de mestrado pretende contribuir com o NPDEAS, através da avaliação da produtividade de biomassa e de lipídeos das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum* em diferentes condições e regimes de cultivo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

A definição brasileira do biodiesel, de acordo com a Resolução n. 7, de 19/03/2008, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), determina que o biodiesel (B100)* é um “combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais”. Esta resolução considera também a Lei n. 11.097, de 13/01/2005, que define o biodiesel como “um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil” (BRASIL, 2008).

A obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado, em qualquer parte do território nacional, foi estabelecida pela Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. De acordo com esta lei, o percentual obrigatório de biodiesel adicionado ao diesel será de 5% oito anos após a publicação da referida lei, havendo um percentual obrigatório intermediário de 2% três anos após a publicação (BRASIL, 2005). O governo antecipou em três anos a mistura obrigatória de 5% de biodiesel ao diesel mineral (B5), segundo informou o Ministério de Minas e Energia (MME), o B5 entrará em vigor em janeiro de 2010 e não mais em 2013 como estava previsto.

O biodiesel possui propriedades físico-químicas semelhantes ao diesel de petróleo (petrodiesel) e pode substituir, parcialmente ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão do ciclo diesel ou em outros sistemas, como por exemplo equipamentos para geração de energia elétrica. As principais vantagens do biodiesel, em relação ao petrodiesel, são: seu caráter renovável e biodegradável; seu maior ponto de fulgor (proporcionando manuseio e armazenamento mais seguro); a boa lubricidade (redução de desgaste do motor); a possibilidade de aproveitamento de rejeitos, tais como gorduras de animais e óleo de cozinha usado; livre de enxofre e aromáticos; a menor emissão de material

* O biodiesel pode ser usado misturado ao óleo diesel de petróleo em qualquer proporção. A concentração de biodiesel é informada por meio de uma nomenclatura específica, definida por "BX", onde X refere-se à porcentagem em volume do biodiesel ao qual é misturado ao diesel de petróleo. Assim, B5, B20 e B100 referem-se, respectivamente às misturas de biodiesel/diesel contendo 5, 20 e 100% de biodiesel.

particulado, monóxido de carbono e óxidos sulfúricos; o incentivo a um desenvolvimento regional sustentado gerando empregos em áreas rurais; a geração de créditos de carbono vinculados ao Mecanismo de Desenvolvimento Limpo decorrentes do Protocolo de Kioto (PARENTE, 2003; VISCARDI, 2005; SONG; FU; SHI, 2008). Por outro lado, o preço do biodiesel atualmente é maior do que o petrodiesel e a queima do biodiesel emite maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NOx), que são prejudiciais a saúde (BAN-WEISS *et al.*, 2007; ANP, 2009).

2.1.1 Matérias-primas para produção de biodiesel

As matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de biodiesel são os óleos vegetais (soja, algodão, canola, palma, girassol, entre outros), as gorduras animais e os óleos residuais de restaurantes. Outras fontes de matérias-primas, para as quais o processamento ainda não é bem estabelecido, são as gorduras provenientes de esgotos e estações de tratamento de efluentes, e o óleo de microalgas. Os óleos vegetais e as gorduras animais são basicamente constituídos de triglicerídeos, mas podem conter uma pequena quantidade de outros compostos, tais como fosfolipídeos, pigmentos, flavorizantes e enzimas (MELO, 2007).

O óleo de soja tem sido a matéria-prima mais utilizada para a fabricação do biodiesel, seguida do sebo bovino e do óleo de algodão. No mês de novembro de 2009, a participação ficou em 75,0% para o óleo de soja, 17,8% para o sebo, 5,1% para óleo de algodão e 2,1% para outras matérias-primas (MME, 2009).

A escolha da matéria-prima constitui um fator crítico no custo final do biodiesel. A matéria-prima representa 50 a 85% do custo total do biodiesel. Portanto, para minimizar o custo do biodiesel, é importante fazer uma avaliação da matéria-prima em relação ao rendimento, qualidade e aproveitamento dos subprodutos (TEIXEIRA; MORALES, 2006; SONG; FU; SHI, 2008).

2.1.2 Tecnologias para produção de biodiesel

Os óleos vegetais e as gorduras animais *in natura* têm índices de fluidez e viscosidade mais elevados do que o petrodiesel. Devido a estas características, estes óleos e gorduras *in natura* não são adequados para uso em motores de

combustão do ciclo diesel convencionais, pois podem provocar entupimentos e problemas com baixa qualidade de ignição. Por isso, estas matérias-primas são transformadas em biodiesel. O biodiesel pode ser obtido por diferentes processos tais como o craqueamento, o hidrocraqueamento, a esterificação, e a transesterificação, sendo este último o mais conhecido e utilizado atualmente (PARENTE, 2003; CARTONI, 2009).

A transesterificação pode ocorrer através de diferentes processos, tais como a transesterificação ácida, alcalina, enzimática, em solvente supercrítico e *in situ*. A transesterificação consiste basicamente de uma reação reversível onde os triglicerídeos do óleo ou gordura (vegetal ou animal) reagem com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) geralmente na presença de um catalisador, formando ésteres (metílicos ou etílicos) de ácidos graxos e deixando glicerina como subproduto. Esta reação ocorre em três etapas, conforme Figura 1, inicialmente, as moléculas de triglicerídeos são convertidas em diglicerídeos, depois em monoglicerídeos e, finalmente, em glicerol (CARTONI, 2009).

A produção de biodiesel através da transesterificação alcalina é a rota mais utilizada industrialmente. Esta rota é a mais utilizada devido a razões econômicas, ao menor tempo de reação e aos melhores rendimentos obtidos comparados a transesterificação ácida. Em relação ao álcool, mundialmente, o metanol é mais utilizado do que o etanol, devido à sua maior disponibilidade, aos custos mais baixos e a maior conversão dos triglicerídeos em biodiesel (KHALIL, 2006).

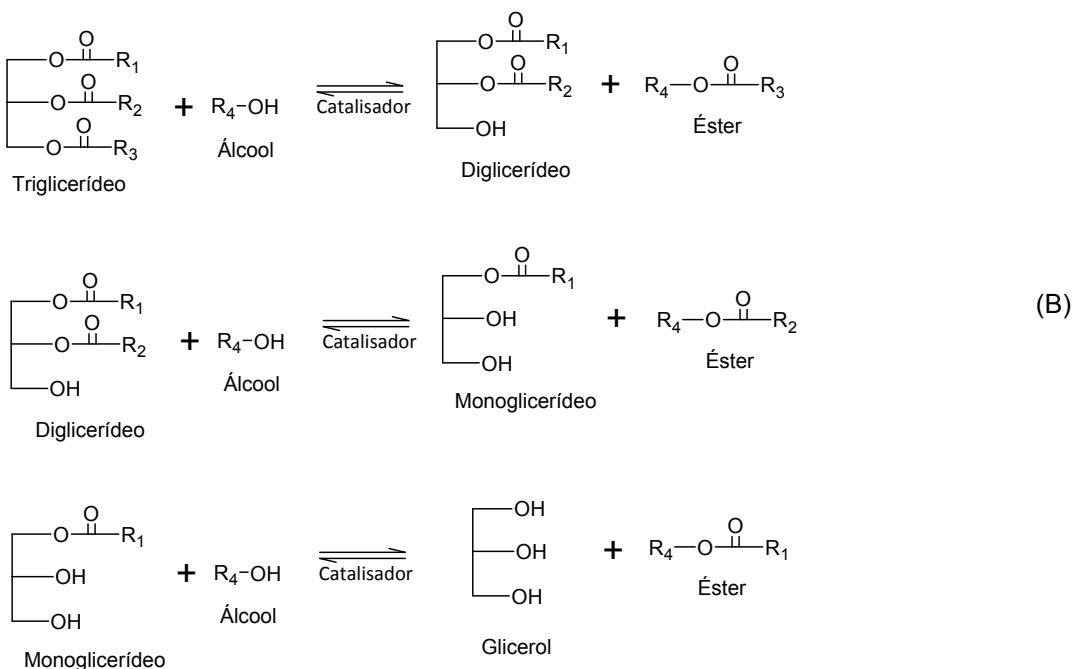
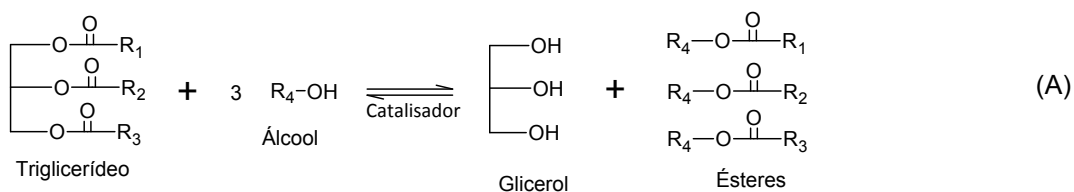


FIGURA 1 - REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS

(A) TRANSESTERIFICAÇÃO SIMPLIFICADA; (B) TRANSESTERIFICAÇÃO COM ETAPAS INTERMEDIÁRIAS. ONDE: R1, R2 E R3 REPRESENTAM RADICAIS DE HIDROCARBONETOS SATURADOS OU INSATURADOS E R4 REPRESENTA O RADICAL METIL OU ETIL

FONTE: O AUTOR (2009)

2.2 MICROALGAS COMO FONTE DE BIODIESEL

A substituição de todo o combustível derivado de petróleo utilizado pelo setor de transportes nos Estados Unidos da América (EUA) por biodiesel de oleaginosa requeria 0,53 bilhões de m³ de biodiesel anualmente, na razão de consumo de 2007. Para abastecer 50% do combustível utilizado pelo setor de transporte nos EUA utilizando o óleo de palma, que é derivado de uma planta com alto rendimento de óleo por hectare, seria necessário 24% do total da área agrícola disponível no país. Em contraste, se for usado óleo de microalgas, cultivado em fotobiorreatores, seria necessário apenas 1 a 3% do total da área de cultivo (CHISTI, 2007).

As microalgas são compostas basicamente de proteínas, carboidratos e lipídeos. Os teores de lipídeos de microalgas encontrados na literatura variam de 5 a

75% em porcentagem de biomassa seca, mas a maioria das espécies estudadas apresenta de 20 a 50% de lipídeos. Os triglicerídeos das microalgas conhecidas apresentam composição em ácidos graxos (14 a 22 átomos de carbono) semelhante a dos óleos vegetais usados na produção de biodiesel (METTING, 1996; SPOLAORE *et al.*, 2006; SONG; FU; SHI, 2008; MATA; MARTINS; CAETANO, 2009).

A Tabela 1 mostra uma comparação entre a composição dos ácidos graxos do óleo de soja e do óleo de algodão que são óleos vegetais utilizados atualmente para a produção de biodiesel no Brasil, e do óleo de duas espécies de microalgas marinhas. Nota-se que os teores de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dos óleos vegetais são similares aos das microalgas aqui comparadas.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS (%) DE ÓLEOS VEGETAIS E DE MICROALGAS MARINHAS

Ácido Graxo	Óleo de Soja	Óleo de Algodão	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i>
C14:0	0,0	1,5	7,4	3,9
C16:0	14,0	25,0	11,3	20,5
C16:1	0,0	0,0	22,4	25,2
C16:2	0,0	0,0	5,4	0,8
C16:3	0,0	0,0	12,3	0,6
C16:4	0,0	0,0	1,4	0,0
C18:0	4,0	1,7	0,4	1,8
C18:1	24,0	28,0	2,8	4,1
C18:2	52,0	40,0	1,5	2,2
C18:3	5,0	0,5	1,4	0,9
C18:4	0,0	0,0	0,5	0,1
C20:0	0,4	0,0	0,0	0,0
C20:2	0,0	0,0	0,2	0,1
C:20:3	0,0	0,0	0,1	0,3
C20:4	0,0	0,0	0,6	5,3
C20:5	0,0	0,0	28,4	29,7
C22:0	0,6	0,0	0,0	0,0
C22:6	0,0	0,0	0,7	0,0
Outros	0,0	3,3	3,2	4,5
AGS	19,0	28,2	19,1	26,2
AGMI	24,0	28,0	25,2	29,3
AGPI	57,0	40,5	52,5	40,0

FONTE: O AUTOR, ADAPTADO DE ZHUKOVA E AIZDAICHER (1995); DANTAS (2006); IHA E SUAREZ (2009)

AGS: Ácidos graxos saturados; AGMI: Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: Ácidos graxos poliinsaturados

Diferentes estudos mostram diversas vantagens do uso de microalgas para a produção de biodiesel em comparação com outras matérias-primas disponíveis (SHEEHAN *et al.*, 1998; CHISTI, 2007; ROSENBERG *et al.*, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009). Dentre as vantagens, destacam-se:

- os sistemas de cultivo de microalgas podem ser construídos em solo não arável, não competindo com o solo para a agricultura. O cultivo de microalgas consome menos água do que o cultivo de oleaginosas, pois a água utilizada para o cultivo pode ser reaproveitada após a recuperação da biomassa. Além disso, as microalgas podem crescer em água do mar, que é imprópria para consumo humano;
- a produção de biomassa pode ser combinada com fixação de dióxido de carbono (CO₂) proveniente de gases de exaustão liberados nos processos industriais. Isto contribui para o aumento da produtividade de biomassa microalgal e redução de CO₂ na atmosfera;
- o ciclo de vida das microalgas se completa mais rapidamente do que das plantas terrestres, e dependendo da região e da espécie cultivada, as algas podem produzir o ano inteiro;
- as microalgas são unicelulares, o que permite uma composição uniforme das células de um meio de cultura, o que não ocorre com as oleaginosas, que podem ser divididas em diferentes partes (frutos, folhas, sementes e raízes) com composições variadas.

A biomassa residual da microalga que sobra após extração do óleo pode ser utilizada para gerar energia (biogás) no processo ou gerar co-produtos com valor comercial. O aproveitamento dos resíduos poderá contribuir para redução dos custos de produção do biodiesel (CHISTI, 2008).

Dentre os principais co-produtos com valor comercial que podem ser extraídos da biomassa microalgal destacam-se: os pigmentos (carotenóides, astaxantina, ficobilina) utilizados em aditivos alimentares, indústria cosmética e farmacêutica; os polímeros (polissacarídeos, amido) utilizados em aditivos alimentares e na indústria cosmética; e os ácidos graxos poliinsaturados (ácido eicosapentanoico – EPA, ácido araquidônico – ARA, e ácido docosahexanoico – DHA) que são utilizados como suplemento alimentar e nutracêuticos (METTING, 1996; DERNER *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006).

2.3 PRODUÇÃO DE MICROALGAS

Os cultivos de microalgas podem ser realizados para pesquisa, manutenção de cepas ou produção de biomassa com finalidade comercial. Independente da finalidade do cultivo recomenda-se manter um cepário (Figura 2A). O cepário é um local reservado para manutenção das cepas de interesse, com condições (temperatura, iluminação) controladas (LOURENÇO, 2006).

Os volumes dos cultivos de microalgas variam de mililitros a bilhões de litros. Os cultivos em menor escala, geralmente são feitos em laboratórios, câmaras incubadoras ou salas climatizadas. Os cultivos, mostrados nas Figuras 2B e 2C, são exemplos de cultivos experimentais em erlenmeyers (500 mL a 2L), bombonas (20L) e sacos de polietileno (100 L).



FIGURA 2 - EXEMPLOS DE CULTIVOS EM PEQUENA ESCALA; (A) CEPÁRIO; (B) CULTIVOS EXPERIMENTAIS EM ERLLENMEYERS E BOMBONAS; (C) CULTIVO EM SACOS DE POLIETILENO

FONTE: (A) (B) O AUTOR (2008); (C) ALGAGEN (2008)

Os cultivos de grande porte, que geralmente são utilizados para produção comercial de biomassa algal, são realizados em tanques ou lagoas e em fotobiorreatores. Estes sistemas podem ser instalados ao ar livre ou em ambiente coberto. No caso de cultivos em locais abertos, a luz solar é aproveitada para o crescimento das microalgas. No caso de instalações em ambientes fechados, há duas possibilidades: locais semelhantes a casas de vegetação, cujo teto (e eventualmente as paredes laterais) é transparente, permitindo o aproveitamento da energia solar (que pode ou não ser reforçada pela ação de lâmpadas fluorescentes) e locais opacos à penetração de luz solar, nos quais a energia luminosa é inteiramente artificial, fornecida por lâmpadas fluorescentes (LOURENÇO, 2006).

2.3.1 Cultivo em tanques

Os tanques para o cultivo de microalgas podem ser construídos em forma circular, retangular, elipsoidal ou cilíndrica, e podem ser conectados, formando um circuito fechado com recirculação e mistura. Independentemente da área do tanque, a profundidade varia de 20 a 30 cm, pois tanques muito profundos prejudicam o aproveitamento da luz pelas células. A agitação constante é essencial para promover uma distribuição uniforme das células, permitindo a iluminação de todas as células. A superfície interna é geralmente lisa, para facilitar a limpeza e evitar danos resultantes do atrito de células com as paredes. O revestimento é feito com material plástico, fibra de vidro ou concreto e o material empregado no revestimento deve ser claro, para permitir maior reflexão de luz (COUTTEAU, 1996; BOROWITZKA, 1999; BRENNAN; OWENDE, 2009).

A configuração e as características operacionais dos tanques variam de acordo com o espaço, volume, aplicação, custos e localização. Por exemplo, no Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), localizado na UFPR, são cultivadas microalgas para alimentação de larvas de caranguejo (larvicultura). Os tanques para produção de microalgas para larvicultura (Figura 3A) são de material plástico, circulares, com capacidade de 500 L e mantidos em ambiente fechado com iluminação artificial. A agitação é feita através de borbulhamento de ar atmosférico por um compressor (GIA, 2008).

Nas Figuras 3B e 3C estão mostrados outros exemplos de lagoas, com configuração diferente dos tanques do GIA. Essas lagoas são retangulares, conectadas entre si, mantidas em ambiente aberto com iluminação natural, e a agitação é feita através de um misturador de pás. A Earthrise Nutritionals, localizada no deserto de Sonora no sudeste da Califórnia (EUA), possui 30 lagoas de 5.000 m² cada, e é atualmente a maior produtora de *Spirulina sp.* do mundo. A biomassa de *Spirulina* produzida é vendida para suplementação alimentar. A Cyanotech, localizada no Hawaii (EUA), produz biomassa de *Spirulina* e astaxantina, que é um poderoso antioxidante derivado da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* (SPOLAORE *et al.*, 2006; CYANOTECH, 2008; EARTHRISE, 2008).

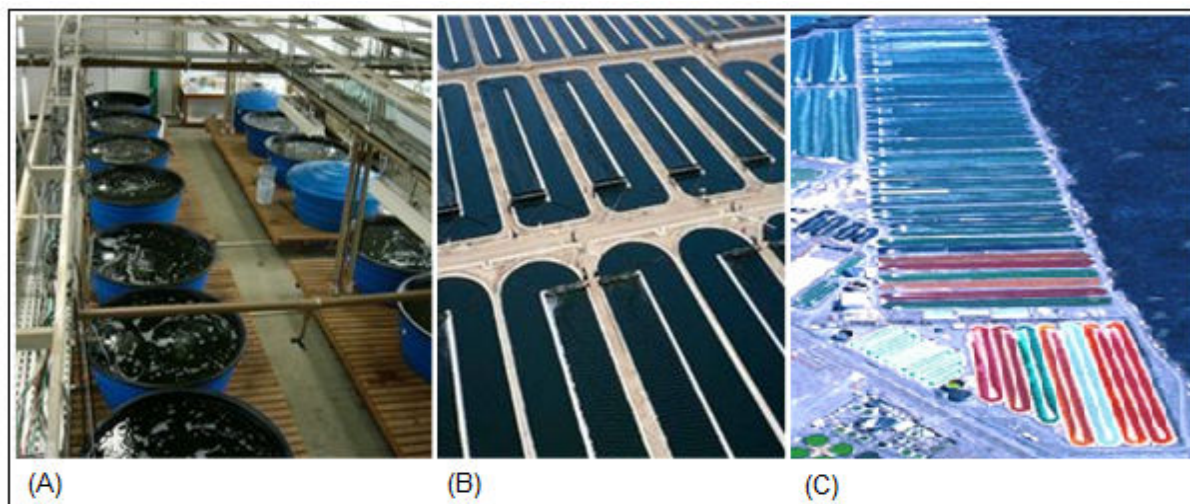


FIGURA 3 - CULTIVO DE MICROALGAS EM TANQUES; (A) PRODUÇÃO DE *Nannochloropsis oculata* EM AMBIENTE FECHADO NO GIA (UFPR); (B) PRODUÇÃO DE *Spirulina sp.* NA CALIFÓRNIA (EUA); (C) PRODUÇÃO DE *Spirulina sp.* E *Haematococcus pluvialis* NO HAWAII (EUA)

FONTE: (A) GIA; (B) EARTHRIZE; (C) CYANOTECH; (2008)

As principais vantagens do sistema de cultivo em tanques são os baixos custos de implantação e operação. Por outro lado, estes sistemas são facilmente contaminados por outros organismos, dificultando o cultivo de uma monocultura. Além disso, os tanques abertos são diretamente afetados por fatores climáticos, tais como variações de temperatura, iluminação, evaporação e ação de chuvas. As chuvas podem gerar diluição excessiva da cultura, afetando severamente o desenvolvimento dos cultivos (SUH; LEE, 2003; CHISTI, 2007; UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

2.3.2 Cultivo em fotobiorreatores

As limitações dos sistemas de cultivo aberto incentivaram o desenvolvimento de sistemas fechados, conhecidos como fotobiorreatores (Figura 4). Os fotobiorreatores consistem basicamente de um arranjo de tubos transparentes que podem ser feitos de material polimérico translúcido ou vidro. Este arranjo de tubos é acoplado a uma bomba de circulação e a uma coluna de desgaseificação, formando um sistema totalmente fechado. O diâmetro dos tubos é dimensionado de forma a obter um melhor aproveitamento da luz, e o arranjo entre eles pode se apresentar na forma helicoidal, vertical e horizontal (GRIMA et. al., 1999; CHISTI, 2007).

Os primeiros fotobiorreatores foram desenvolvidos para cultivos de microalgas em ambientes fechados e com volumes de 20 a 40 litros. O avanço tecnológico ocorrido nas últimas décadas levou ao desenvolvimento de fotobiorreatores cada vez maiores, comportando centenas de metros cúbicos de volume. A tendência atual é o desenvolvimento de sistemas cada vez mais automatizados de agitação, aeração, colheita e filtração, mediante a instalação de sensores em pontos específicos que permitem avaliação eficiente da produtividade de biomassa do cultivo. Outras variáveis importantes, como pH, teor de oxigênio dissolvido, concentrações de CO₂ e temperatura, são também controláveis por sensores específicos. Essas inovações aos poucos vêm contribuindo para aumentar a produtividade de fotobiorreatores, que hoje alcançam a produção de biomassa seca da ordem de 5 a 10 g.L⁻¹ para várias espécies cultivadas em regime de batelada (LOURENÇO, 2006).

O maior fotobiorreator do mundo (Figura 4A), em operação desde 2000, está localizado na Alemanha e pertence à empresa Ökologische Produkte Altmark (ÖPA). Este fotobiorreator consiste em 500.000 m de tubos de vidro, distribuídos em vinte módulos com volume de 35 m³ cada, situados no interior de uma casa de vegetação de 10.000 m². A cultura é circulada através dos tubos por bombas centrífugas e produz 130 a 150 toneladas por ano de biomassa de *Chlorella*. Outro exemplo de fotobiorreator (Figura 4B) tubular, com arranjo dos tubos similar ao do fotobiorreator da Alemanha, está localizado em Israel. Porém, este fotobiorreator está exposto diretamente à luz solar e produz *Haematococcus pluvialis*.

A empresa Green Fuel Technologies, localizada em Cambridge (MA), desenvolveu um fotobiorreator (Figura 4C), em escala piloto, para cultivo de microalgas, com o objetivo de seqüestrar carbono. O fotobiorreator foi instalado no telhado de uma usina termoelétrica do Instituto de Tecnologia de Massachussets (MIT). Os gases de exaustão emitidos pela termoelétrica foram introduzidos no fotobiorreator e a concentração de CO₂ da cultura microalgal foi monitorada. Foi observada uma redução da concentração de CO₂, introduzido no sistema, de 82,3% em dias ensolarados e de 50,1% em dias nublados (TECHNOLOGY, 2008).

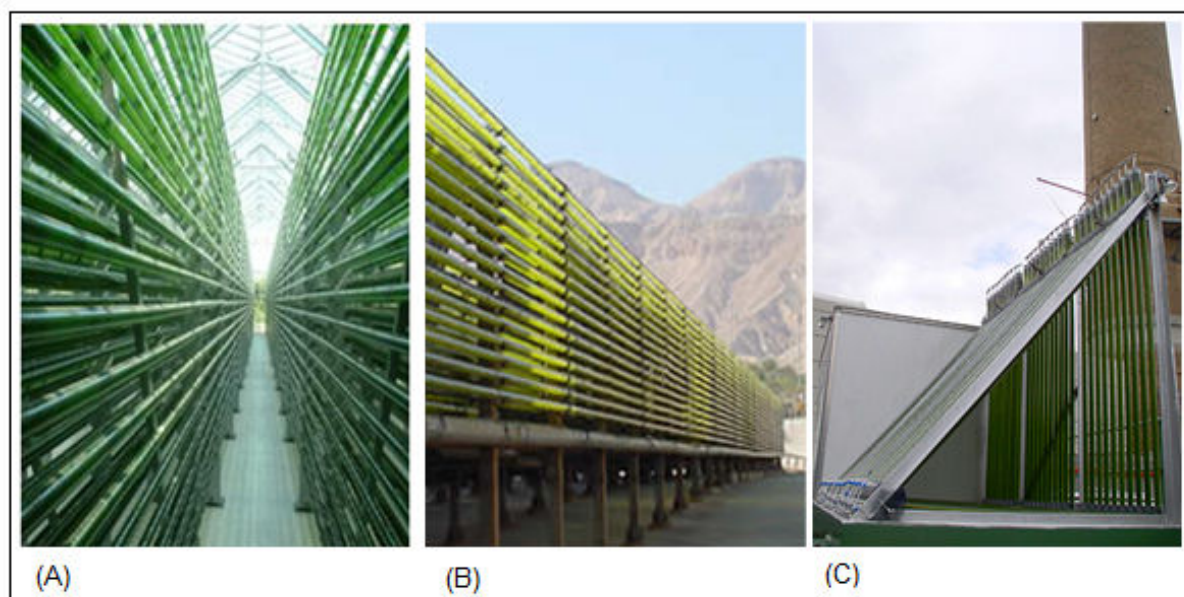


FIGURA 4 - CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREATORES; (A) PRODUÇÃO DE *Chlorella* EM FOTOBIORREATOR EM CASA DE VEGETAÇÃO NA ALEMANHA; (B) CULTIVO EM FOTOBIORREATOR INDUSTRIAL AO AR LIVRE EM ISRAEL; (C) CULTIVO EXPERIMENTAL EM FOTOBIORREATOR NO MIT
 FONTE: (A) PULZ E GROSS (2004); (B) ALGATECH (2008); (C) TECHNOLOGY (2008)

Diversos parâmetros, dos sistemas abertos e fechados, são comparados na Tabela 2. Os custos de um fotobiorreator são mais elevados do que os de tanques, mas a eficiência e o rendimento da biomassa são maiores. Outras vantagens do uso deste sistema fechado em relação ao sistema aberto são: redução de contaminação, redução de perdas por evaporação, menor ocupação de espaço, e um maior controle das trocas gasosas entre o cultivo e o ar atmosférico. Além disso, a produtividade de biomassa ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) em um fotobiorreator é treze vezes maior comparado a um cultivo em lagoa aberta (SUH; LEE, 2003; CHISTI, 2007; UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE CULTIVOS DE MICROALGAS ABERTO (LAGOA) E FECHADO (FOTOBIORREATOR)

Parâmetros	Tanques (lagos) abertos	Fotobiorreatores (sistemas fechados)
Custo de implantação	Baixo	Alto
Custo de operação	Baixo	Alto
Risco de contaminação	Extremamente alto	Baixo
Controle das espécies	Difícil	Fácil
Evaporação da cultura	Extremamente alta	Insignificante
Eficiência de utilização da luz	Baixa	Alta
Qualidade da biomassa	Baixa	Alta
Reprodutibilidade dos parâmetros de produção	Difícil	Fácil
Controle do processo	Difícil	Fácil
Padronização	Muito difícil	Possível
Ação de chuvas	Afeta diretamente a produção	Insignificante, pois o sistema fechado permite a produção com chuva
Start-up	6 a 8 semanas	2 a 4 semanas
Produtividade de biomassa	Baixa	3 a 5 vezes > lagoa

FONTE: O AUTOR, ADAPTADO DE PULZ (2001); MATA; MARTINS; CAETANO (2009)

2.3.3 Meios de cultivo para microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em meios de cultivo marinho, água doce e salobra. Os meios de cultivo são compostos por vitaminas e nutrientes, estes nutrientes são compostos por macronutrientes (carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, silicato, enxofre e potássio) e micronutrientes (ferro, manganês, cobre, molibdênio, cobalto, zinco, entre outros) (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

A composição dos meios de cultivo varia de acordo com a espécie. Não existe um único meio de cultivo viável para o crescimento de todas as espécies de microalgas, pois certas microalgas têm necessidades específicas. Por exemplo, silicato é usado especificamente para o crescimento das diatomáceas que utilizam este composto para a formação de uma carapaça externa, chamada de frústula (COUTTEAU, 1996).

A produção de biomassa algácea em cultivos massivos envolve o uso de meios de cultivo classificados como semidefinidos e definidos quanto à composição química. Os meios de cultivo semidefinidos são preparados com água do mar natural suplementada com nutrientes e vitaminas. Os meios de cultivo definidos são preparados a partir de água, deionizada ou destilada, suplementada com nutrientes, vitaminas e sais inorgânicos, a fim de simular a composição da água do mar. Um exemplo de meio de cultivo semidefinido amplamente utilizado é o meio Guillard F/2 (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

Atualmente, os meios de cultivo semidefinidos são os mais utilizados para a produção de microalgas marinhas em escala comercial, principalmente quando o sistema localiza-se próximo ao mar. Por exemplo, a empresa Congnis Nutrition and Health, localizada em Hutt Lagoon (Austrália), produz *Dunaliella salina* em tanques a beira mar (Figura 5A). Na Figura 5B está mostrado outro exemplo de um cultivo a beira mar, localizado no Hawaii (EUA) de *Nannochloropsis oculata*.

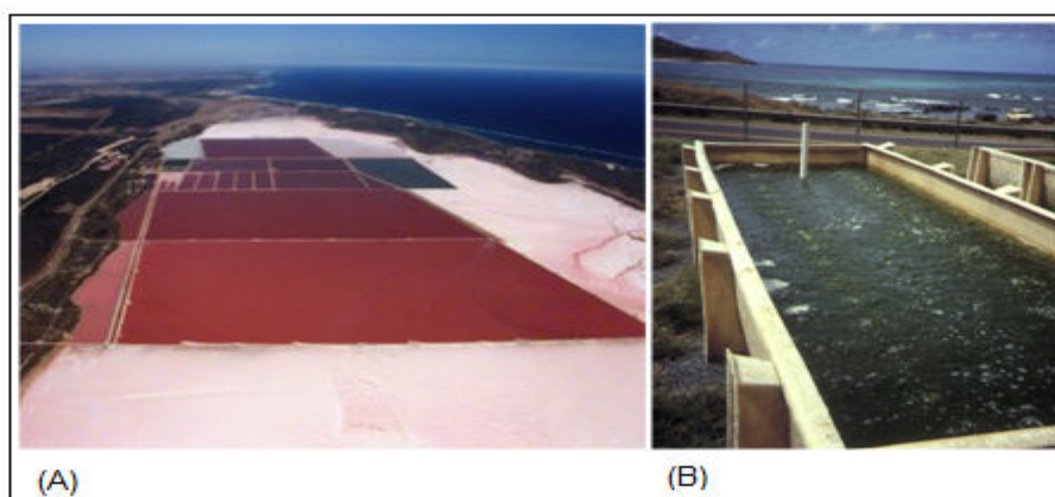


FIGURA 5 - TANQUES DE CULTIVO DE MICROALGAS MARINHAS A BEIRA MAR; (A) PRODUÇÃO DE *Dunaliella salina* NA AUSTRÁLIA; (B) PRODUÇÃO DE *Nannochloropsis oculata* NO HAWAII

FONTE: BEAM (2008)

2.3.4 Regimes de cultivo de microalgas

Os regimes de cultivo aplicados na produção de microalgas variam de acordo com a forma de operação do sistema. Os três tipos básicos de operação de sistemas de cultivos de microalgas são: batelada, semicontínuo e contínuo, que são discutidos nos itens seguintes.

2.3.4.1 Cultivo em batelada

Nos cultivos em batelada ou estanque, as células de microalgas são inoculadas ao meio de cultivo e após inoculação não ocorre adição de nutrientes ao longo do desenvolvimento da cultura. O cultivo é encerrado quando os nutrientes da cultura se esgotam ou quando o produto desejado for produzido. Este tipo de cultivo é caracterizado por apresentar fases distintas de crescimento. A duração de cada fase depende basicamente de fatores como a espécie cultivada e as condições de cultivo oferecidas (COUTTEAU, 1996).

A primeira fase é de adaptação e ocorre logo após a inoculação, nesta fase não ocorre aumento de células. Após a fase de adaptação, as células começam a se duplicar rapidamente em intervalos regulares de tempo. Nesta fase, chamada de exponencial, a velocidade de crescimento é máxima. Durante o crescimento exponencial, os nutrientes se tornam limitados e a disponibilidade de luz diminui gradativamente, conseqüentemente a velocidade de crescimento reduz. Devido às condições limitantes do meio, parte das células morre, enquanto que outras células continuam se dividindo, ou seja, a taxa de crescimento é próxima da taxa de mortalidade, caracterizando a fase estacionária de crescimento. Entre as fases exponencial e estacionária de crescimento, ocorre uma fase intermediária (fase de transição), onde ocorre um pequeno aumento do número de células, mas que não pode ser considerado exponencial. A perda progressiva de condições de crescimento leva ao aumento da taxa de mortalidade, que ultrapassa a taxa de crescimento celular, dando início a fase de declínio ou morte da cultura. As mudanças que ocorrem na cultura nas diferentes fases de crescimento refletem no estado fisiológico e na composição química das células (LOURENÇO, 2006).

As fases de crescimento são representadas por uma curva de crescimento microalgal, que pode ser elaborada com dados de biomassa ou de número de células por volume pelo tempo. Não existe um modelo matemático específico para representar o crescimento de microalgas em cultivos em batelada. Diferentes autores avaliaram o crescimento de microalgas apenas na fase exponencial de crescimento, utilizando regressão exponencial (GUILLARD, 1984; BORGES, 2005; MORAIS; COSTA, 2007; MEINERZ, 2007). No entanto, Derner (2006) e Ohse *et al.* (2008) optaram pelo modelo logístico, que considera desde a fase inicial de crescimento (fase de adaptação) microalgal até a fase estacionária (inclusive), e

segundo Olivera¹ (1998, citado por Derner, 2006), o modelo de regressão logística é o que melhor se ajusta aos dados de crescimento celular obtidos em cultivos estanques de microalgas.

Os cultivos em batelada podem ser utilizados em pesquisas e em cultivos comerciais. Como exemplo de aplicações em pesquisa, pode-se mencionar a elucidação das transformações químicas sofridas pelas microalgas ao longo do desenvolvimento, nas diferentes fases de cultivo. Lourenço *et al.* (2004) avaliaram a alteração da composição química, de 12 espécies de microalgas marinhas, em cultivo estanque. Os resultados mostraram que a razão atômica de carbono:nitrogênio (C:N) nas células aumentou ao longo do desenvolvimento dos cultivos. Os autores concluíram que proteínas e nitrogênio total são mais abundantes nas células na fase exponencial de crescimento, quando os nutrientes do meio de cultura são fartos; porém, as concentrações de proteínas e de nitrogênio diminuem na fase estacionária de crescimento.

As concentrações de carboidratos e lipídeos, por célula de microalga, são menos abundantes na fase exponencial de crescimento (onde a demanda por energia é alta) e aumentam na fase estacionária (EMDADI; BERLAND, 1989; REIREZ *et al.*; 1989). Em cultivos comerciais, evita-se a fase de declínio, geralmente a colheita da biomassa é feita quando a densidade celular atinge seu valor máximo, que ocorre ao final da fase exponencial (LOURENÇO, 2006).

2.3.4.2 Cultivo semicontínuo

No cultivo semicontínuo, um volume conhecido de cultura microalgal é removido, periodicamente, e substituído por meio de cultivo novo. Neste tipo de cultivo, a composição química das células tende a sofrer poucas alterações ao longo do tempo (pois elas permanecem em condições de crescimento sem fatores limitantes), ao contrário do que acontece em cultivos estanques.

A repetição das diluições em dias consecutivos permite remover grande biomassa de alga diariamente. Teoricamente este processo pode ser operado

¹ OLIVERA, A. Avaliação do valor nutricional das microalgas *Chaetoceros calcitrans* (PAULSEN) TAKANO e *Tetraselmis tetratheae* (KYLIN) BUTCH e do microcrustáceo *Artemia franciscana* (KELLOGG, 1906) utilizados como alimento inicial de larvas de *Penaeus paulensis* (PÉREZ FARFANTE, 1967). 128f. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Fundação Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 1998.

indefinidamente, porém a manipulação freqüente da cultura, ocasionada pelas diluições sucessivas, pode acarretar problemas de contaminação. Sendo assim, na prática, os cultivos semicontínuos devem ser reiniciados periodicamente.

A taxa de diluição, que é definida como a relação do volume de cultura recolhido por tempo pelo volume total da cultura, influencia diretamente na densidade celular da cultura. Quanto maior a taxa de diluição, menor a concentração de biomassa e conseqüentemente maior a disponibilidade de luz. Altas taxas de diluição são apropriadas para células de crescimento rápido, onde a iluminação boa só é possível em densidades celulares baixas. Baixas taxas de diluição originam culturas com crescimento limitado pelo auto-sombreamento (CAMACHO *et al.*, 1999).

2.3.4.3 Cultivo contínuo

No cultivo contínuo, um fluxo constante de cultura microalgal é removido do biorreator simultaneamente com a entrada de meio de cultivo fresco. As taxas de crescimento são reguladas e a densidade celular é controlada automaticamente por sensores óticos. A concentração de células e nutrientes é mantida constante e o cultivo atinge estado estacionário. O cultivo pode permanecer em estado estacionário por um período prolongado, conseqüentemente, são produzidas grandes quantidades de células de alta qualidade e homogeneidade. No entanto, o cultivo contínuo tem um custo elevado devido à necessidade de automação e condições de temperatura e iluminação constantes (MATA; MARTINS; CAETANO, 2009).

2.4 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

A recuperação da biomassa da cultura requer uma ou mais etapas de separação sólido-líquido. A biomassa pode ser recuperada por centrifugação, filtração e sedimentação. Estes processos podem ser precedidos por uma etapa de floculação. A recuperação da biomassa é dificultada devido ao pequeno tamanho (tipicamente na faixa de 2 a 30 μm) das células de microalgas e devido à baixa densidade celular (0,3 a 5 kg.m^{-3}) da cultura. Então, para recuperar uma quantidade razoável de biomassa é necessário processar grandes volumes de cultura. O custo

da etapa de recuperação da biomassa varia de 20 a 30% do custo total da produção de biomassa microalgal (GRIMA *et al.*, 2003).

A escolha da técnica de recuperação da biomassa depende principalmente das características da microalga (tamanho e densidade), do volume da cultura, da aplicação da biomassa e dos custos envolvidos no processo (OLAIZOLA, 2003; BRENNAN; OWENDE, 2009). As formas mais comuns de recuperar a biomassa de microalgas são tratadas a seguir.

A floculação consiste na redução da carga elétrica superficial das células. Este processo desestabiliza as células e estimula a agregação de células, que formam flocos e decantam. O processo de floculação pode ocorrer de forma espontânea (biofloculação) ou induzida. A biofloculação é um processo difícil de ser controlado e geralmente imprevisível e, quando ocorre, geralmente significa problema a ser resolvido. O processo de floculação induzida pode ocorrer por adição ao meio de cultura de sais catiônicos (NaOH, FeCl₃, Al₂SO₄), polímeros catiônicos (quitosana, poliacrilamida) e bases fortes (NaOH, Ca(OH)₂) que promovam alteração do pH. Idealmente o agente floculante deve ser barato, atóxico e eficiente em baixas concentrações. A floculação é um processo simples e econômico, podendo ser utilizado em escala industrial para redução do volume total do cultivo (GRIMA *et al.*, 2003; LOURENÇO, 2006).

A filtração de culturas microalgais é dificultada pelo pequeno tamanho celular característico das microalgas. Portanto, este tipo de processo não é aconselhado para escala industrial. Mesmo em laboratório, é reduzida a quantidade de células que se pode concentrar num filtro, que geralmente entope quando uma camada contínua de células se forma sobre sua superfície (LOURENÇO, 2006).

A centrifugação é um processo simples que pode ser aplicado com qualquer tipo de microalga. A biomassa é concentrada sem a adição de produtos químicos, conservando suas características originais. Porém, em escala comercial a centrifugação envolve elevado custo de energia. Dependendo do valor do produto final, o custo da centrifugação pode inviabilizar a produção (GRIMA *et al.*, 2003).

2.5 FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DE MICROALGAS

O crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, e os fatores físico-químicos que afetam o crescimento das microalgas estão relacionados à temperatura, luz, mistura, disponibilidade de nutrientes, entre outros (GUILLARD, 1975; FALKOWSKI; RAVEN, 1997; RICHMOND, 2004). A seguir, são discutidos alguns fatores.

2.5.1 Temperatura

A temperatura afeta a composição, as taxas metabólicas e o crescimento celular das microalgas. No entanto, a resposta à temperatura de crescimento varia de espécie para espécie, sem nenhuma relação generalizada para todas as espécies (RAVEN E GEIDER, 1988; JAMES; AL-HINTY; SALMAN, 1989).

O aumento da temperatura da cultura microalgal causa um aumento no teor de proteínas e uma diminuição nos teores de carboidratos e lipídeos das células. Além disso, com um aumento de temperatura muitas espécies de microalgas diminuem os percentuais de ácidos graxos insaturados e aumentam os percentuais dos ácidos graxos saturados da fração lipídica (MORTENSEN; RAINUZZO; KNUTSEN, 1988). O grau de insaturação dos ácidos graxos está associado à fluidez da camada fosfolipídica da membrana celular, que se torna menos fluida com uma diminuição do número de insaturações na cadeia de ácidos graxos. Estes efeitos são indicativos de interrupções dos processos de dessaturação das cadeias de ácidos graxos em altas temperaturas (THOMPSON; GUO; HARRISON, 1992a; OLIVEIRA *et al.*, 2004; RENAUD *et al.*, 2004).

Renaud *et al.* (2004) estudaram espécies de microalgas tropicais do litoral da Austrália e constataram aumentos significativos na produção de ácidos graxos saturados 14:0, 16:0 e 18:0 com o aumento da temperatura em todas as espécies. Neste estudo foram constatados também a diminuição dos percentuais dos ácidos graxos poliinsaturados, ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6). No entanto, Thompson *et al.* (1992b) avaliaram oito espécies de microalgas em diferentes temperaturas e não encontraram uma relação consistente entre o aumento da temperatura e o grau de insaturação dos ácidos graxos.

Temperaturas constantes são desejáveis ao cultivo das microalgas, pois proporcionam maior estabilidade em experimentos, maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies. O controle da temperatura nos cultivos em laboratório é facilmente alcançado através de salas climatizadas. Por outro lado, o controle da temperatura para cultivos em escala comercial é dificultado, pois nem sempre é possível manter a temperatura (LOURENÇO, 2006). Nos cultivos comerciais, devido a flutuações sazonais e diurnas, a temperatura representa uma das principais limitações biológicas para a produção de biomassa de microalgas. De fato, a dificuldade em manter a temperatura ideal é um dos fatores que causam a produtividade baixa de biomassa em tanques abertos. Torzillo *et al.*² (1986, citado por Suh e Lee, 2003) compararam a produção de *Spirulina* em um tanque aberto e em um fotobiorreator, e obtiveram melhores rendimentos em biomassa no cultivo no fotobiorreator. O melhor rendimento foi atribuído ao melhor perfil de temperatura mantido dentro do fotobiorreator.

2.5.2 Luz

A luz é essencial para o desenvolvimento das microalgas fotoautotróficas. A quantidade de energia luminosa recebida pelas células irá repercutir na quantidade de carbono fixado, influenciando conseqüentemente na produção de biomassa e na taxa de crescimento das culturas microalgais (DERNER, 2006).

A fonte de luz é classificada em termos de fotoperíodo (horas de luz: horas de escuro), qualidade e intensidade espectral (comprimento de onda). A luz utilizada pelas algas fotossintetizantes encontra-se na faixa espectral da radiação solar de 400 a 700 nm, que corresponde à radiação fotossinteticamente ativa (PAR). A luz é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes (unidades fotossintéticas). Esses pigmentos são classificados em três grupos: as clorofilas, os carotenóides e as ficolibinas, sendo que cada um difere em sua composição química e apresenta diferente capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda (SUH; LEE, 2003).

Durante a fotossíntese, as unidades fotossintéticas são ativadas (F*) pela absorção de fótons. Esta etapa de captura de luz inicial é rápida e não enzimática. Nas etapas seguintes, as unidades ativadas (F*) são lentamente consumidas em

² TORZILLO, G.; PUSHPARAJ, B.; BOCCI, F.; BALLONI, W.; MATERASSI, R.; FLORENZANO, G. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. Biomass, v. 11, p. 61-74, 1986.

reações mediadas por enzimas que regeneram as unidades fotossintéticas (F^0) e fornecem energia para a manutenção e produção de biomassa (RUBIO *et al.*, 2003).

O efeito da intensidade da luz (irradiância ou iluminação) nos cultivos de microalgas tem sido estudado em detalhes. A quantidade de luz absorvida pelas células microalgais em suspensão dependem de vários fatores, que incluem a distribuição das células no meio de cultura, a densidade celular e a pigmentação das células (SUH; LEE, 2003; RUBIO *et al.*, 2003; LEE *et al.* 2006).

O aumento da concentração celular microalgal, no decorrer do cultivo, gera o efeito de auto-sombreamento entre as células, isto diminui a quantidade de luz disponível por célula. Como resultado disto, a eficiência fotossintética diminui, acarretando uma diminuição da produtividade de biomassa. O aumento da intensidade luminosa gera um aumento da produtividade de biomassa até certo ponto, porém, acima deste ponto, os fotossistemas das unidades fotossintéticas são danificados e a produtividade de biomassa diminui. Estes danos causados pelo excesso de luz são descritos usando o termo fotoinibição. Por estes motivos, é importante manter um nível adequado de luz durante todo o período de cultivo celular (RUBIO *et al.*, 2003; RICHMOND, 2004).

Lee *et al.* (2006) avaliaram em seu trabalho o efeito de diferentes taxas de absorção da luz pelas células de microalgas cultivadas em fotobiorreatores. Neste estudo foram comparados a densidade celular máxima atingida por um cultivo celular exposto a um padrão de iluminação constante com outros cultivos expostos a taxas de iluminação que variavam ao longo do cultivo em relação ao número de células e a área de projeção das células. Foram obtidos os seguintes resultados: considerando a taxa de iluminação aplicada por célula foi obtido um aumento da concentração celular de 160% em relação ao padrão (iluminação constante) e considerando a taxa de iluminação variando pela área das células, foi obtido um aumento da concentração celular de 140% em relação ao padrão.

Fuentes *et al.* (2001) avaliaram a composição bioquímica da biomassa da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, cultivada em diferentes condições, e concluíram que ao aumentar a irradiância, houve um aumento da produtividade de biomassa, porém, o teor de lipídeos diminuiu. Este fato foi relacionado com o tempo de residência das células no meio de cultura.

2.5.3 Mistura, aeração e bombeamento

O processo de mistura de uma suspensão microalgal é importante, pois permite que as células fiquem suspensas no meio, melhora a eficiência da utilização da luz, favorece a troca de gases, impede a estratificação térmica e ainda auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes. Todos estes fatores influenciam na produtividade de biomassa microalgal (SUH; LEE, 2003).

Os cultivos de microalgas, quando realizados em escala laboratorial, podem ser misturados com o auxílio de um “shaker”, ou através de aeração. A aeração é feita com injeção de ar (atmosférico ou enriquecido com CO₂), através de mangueiras de silicone, no fundo do frasco contendo a suspensão microalgal. Nos cultivos em grande escala, a mistura é feita de diferentes formas, que dependem da estrutura do tipo de sistema utilizado. Tanques pequenos, geralmente localizados em ambiente coberto, podem ser agitados por aeração, mas para tanques grandes a aeração não é suficiente para assegurar uma distribuição uniforme das células. Neste caso, a mistura é realizada por pás giratórias ou por recirculação da cultura através de bombeamento. Nos fotobiorreatores tubulares, o processo de mistura da suspensão microalgal é realizado por bombas mecânicas (centrífuga, excêntrica, deslocamento positivo-volumétrica, parafuso, peristáltica) ou por bombeamento por borbulhamento de ar (sistema “airlift pump”) (LOURENÇO, 2006; BRENNAN; OWENDE, 2009).

O regime de escoamento da suspensão microalgal, determinado pelo número de Reynolds, é outro fator que influencia na produtividade da biomassa microalgal. O escoamento laminar é caracterizado pelo movimento em lâminas ou camadas, não havendo mistura macroscópica de camadas de fluido adjacentes. O escoamento turbulento é caracterizado pelo movimento tridimensional aleatório das partículas do fluido sobreposto ao movimento da corrente.

O número de Reynolds (Re), calculado pela equação 1, é um número adimensional, que permite identificar se um fluido está escoando de forma laminar ($Re < 3500$) ou turbulenta ($Re > 3500$) (GUDIN ; CHAUMONT, 1991).

$$Re = (\rho \cdot v \cdot D_t) / \eta \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

ρ = densidade do líquido ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$);

v = velocidade linear do líquido ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$);

D_t = diâmetro do tubo do fotobiorreator (m);

η = viscosidade da cultura ($\text{Pa} \cdot \text{s}$).

A otimização da produtividade de biomassa microalgal requer um fluxo turbulento. No entanto, um fluxo turbulento muito alto produzido pelo bombeamento pode causar um estresse hidrodinâmico, que resulta em dano celular. Os principais fatores que estão relacionados ao estresse hidrodinâmico são: geometria do fotobiorreator, que determina a frequência da passagem das células em suspensão pela bomba; o tipo de bomba envolvida; a morfologia celular, e as condições fisiológicas das células (VONSHAK *et al.* 1982; RICHMOND; GROBBELAAR 1986; GUDIN ; CHAUMONT 1991).

As bombas do tipo volumétrica (com rotação do rotor proporcional a vazão do fluido), parafuso e excêntrica provocam menos danos nas células do que as bombas do tipo centrífuga (com rotação do rotor alta e constante, e longo tempo de retenção da cultura dentro do rotor). Um experimento feito com a diatomácea *Porphyridium cruentum*, em um fotobiorreator tubular, mostrou que a produtividade da cultura dobrou ao substituir a bomba centrífuga por uma bomba volumétrica (GUDIN; CHAUMONT, 1991).

Resultados similares foram encontrados em um teste feito com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* em um fotobiorreator tubular. Neste teste, foram comparados dois experimentos. No primeiro experimento, o fotobiorreator foi operado em regime contínuo e a mistura foi feita com injeção de ar atmosférico. Após atingir estado estacionário, a cultura foi recirculada através de uma bomba centrífuga. No segundo experimento, o fotobiorreator foi operado da mesma forma que no primeiro experimento, porém após atingir estado estacionário, a cultura foi recirculada através de uma bomba peristáltica. Foi observado que a bomba centrífuga danificou as células e a concentração de biomassa diminuiu drasticamente, chegando a zero após aproximadamente cinco dias de recirculação com a bomba. No caso do bombeamento com a bomba peristáltica, a concentração de biomassa

diminui um pouco no início da fase de bombeamento, mas logo atingiu estado estacionário novamente (ALIÁS *et al.* 2004).

Em relação aos danos das células de microalgas, em sistemas de mistura nos fotobiorreatores tubulares, aqueles com sistema de bombeamento do tipo “airlift” são considerados menos prejudiciais do que os sistemas com bomba mecânica. No entanto, as bombas mecânicas são mais flexíveis em relação à instalação, operação e projeto do que o sistema de bombeamento “airlift” (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998; GRIMA *et al.*, 2001).

2.5.4 Limitação de nutrientes

Meios de cultivo com diferentes composições são fornecidos às células na forma de CO₂, água e sais minerais. As composições químicas destes meios são derivadas de formulações básicas de meios bem sucedidos com determinadas espécies. As mudanças da composição dos meios de cultivo têm sido adotadas a partir de resultados obtidos por meio de experimentos realizados sobre a necessidade ou a limitação por nutrientes. Os principais elementos limitantes são carbono, nitrogênio, fósforo e ferro. O silício é considerado fator limitante apenas para diatomáceas e silicoflagelados (LOURENÇO, 2006).

As microalgas de uma mesma espécie possuem diferentes quantidades de proteínas, carboidratos e lipídeos, quando cultivadas em meios com diferentes quantidades de nutrientes (WIKFORS, 1986; FÁBREGAS *et al.*, 1996; OTERO; FÁBREGAS, 1997; OTERO *et al.*, 1998). Em testes feitos com as microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Chaetoceros sp.*, foram observados que o aumento do grau de limitação de fósforo, no meio de cultivo, resultou em um aumento no teor de lipídeos da biomassa das duas microalgas. Além disso, o teor de ácidos graxos saturados (16:0) e monoinsaturados (18:1) aumentou, e o teor de ácidos graxos poliinsaturados (18:4 n-3; 20:5 n-3) diminuiu (REITAN; RAINUZZO; OLSEN, 1994). Em outro trabalho, foi observado que a limitação de nitrogênio no cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* resultou em um aumento de 17% no teor lipídico da biomassa analisada (PENTEADO *et al.*, 2009).

O carbono é considerado um dos elementos mais importantes, uma vez que constitui cerca de 50% da biomassa microalgal. Conforme a fonte de carbono empregada, os cultivos de microalgas podem ser classificados em três tipos:

- heterotrófico - o fornecimento de carbono é realizado pela introdução de compostos orgânicos apropriados ao meio de cultura (glicose, glicerol, entre outros);
- mixotrófico - o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo CO₂ atmosférico (CO₂ inorgânico);
- autotrófico (fotoautotrófico) - a única fonte de carbono disponibilizada é o CO₂ inorgânico. Neste caso, o dióxido de carbono pode ser disponibilizado às células por difusão (do ar atmosférico) ou por borbulhamento de ar através de compressores diretamente no meio de cultura.

No meio de cultura, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO₂, ácido carbônico (H₂CO₃⁻), bicarbonato (HCO₃⁻) ou carbonato (CO₃²⁻) e suas proporções dependem do pH. A maioria das espécies microalgais é fotoautotrófica, ou seja, através da fotossíntese obtém-se energia da luz para fixar o carbono a partir do CO₂.

2.6 MICROALGAS

2.6.1 Microalga *Nannochloropsis oculata*

N. oculata (Figura 6) é uma microalga marinha unicelular da classe eustigmatophyte, ela possui células com formato esférico ou levemente ovóide, tem pequeno tamanho celular (aproximadamente 3 µm), parede celular rígida e apresenta ácidos graxos poliinsaturados (MURAKAMI; HASHIMOTO, 2009; RODOLFI *et al.*, 2009). Esta microalga é utilizada atualmente como fonte de alimento de animais aquáticos, especialmente rotíferos, que são usados para alimentação de larvas de peixe. Esta espécie demonstrou uma adaptação à sombra, o que recomendaria o seu cultivo em estações do ano em que há menor radiação solar e temperaturas amenas (BORGES, 2005; DURMAZ, 2007).



FIGURA 6 - CÉLULAS DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata*
FONTE: RCC (2009); UTEX (2009)

Na Tabela 3 são apresentados um resumo de cultivos realizados com a *N. oculata* e os resultados obtidos. Os experimentos foram feitos em diferentes condições de irradiância, fotoperíodo, temperatura, aeração, pH e tipo de biorreator, mas a maioria deles foi feito em condições em que a temperatura e a irradiância foram mantidas constantes ao longo do cultivo. A maior produtividade de lipídeos, obtida até o momento em cultivo autotrófico, foi de $142 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (CHIU *et al.* 2009).

TABELA 3 - CULTIVOS AUTOTRÓFICOS REALIZADOS COM *Nannochloropsis oculata*

REATOR	REGIME DE OPERAÇÃO	MEIO DE CULTIVO	CONDIÇÕES				RESULTADOS				FONTE
			T (°C)	pH	FP (h)	Iluminação ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Aeração	Lípidos (% de biomassa seca)	Lípidos ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	Biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	
Foto-biorreator tubular	Semi-contínuo	Guillard F/2	CC	7,8	CC	CC	Ar atmosférico	21	nc	0,73 ± 0,30	ZITTELLI <i>et al.</i> (1999)
Erlenmeyer (250 mL)	Batelada	Guillard F/2	25	nc	24	100	Ar atmosférico	nc	54,8	0,18	RODOLFI <i>et al.</i> (2009)
Foto-biorreator (20 L)	Batelada	Guillard F/2	25	7,5	24	115	Ar atmosférico (3% CO ₂)	14,7	nc	0,61	RODOLFI <i>et al.</i> (2009)
Foto-biorreator (20 L)	Semi-contínuo	Guillard F/2	25	7,5	24	115	Ar atmosférico (3% CO ₂)	45	nc	0,40	RODOLFI <i>et al.</i> (2009)
Foto-biorreator (800 mL)	Semi-contínuo	Guillard F/2	26 ± 1	7,8	24	300	Ar atmosférico (2% CO ₂)	29,7	142,0 ± 49,0	0,480 ± 0,029	CHIU <i>et al.</i> (2009)

NOTA: T (temperatura); FP (fotoperíodo, luz); nc (não consta); CC (exposto às condições climáticas)

2.6.2 Microalga *Phaeodactylum tricornutum*

P. tricornutum é uma microalga diatomácea, da classe Bacillariophyceae (SHEEHAN *et al.* 1998), ela possui um tamanho celular relativamente grande, 3 µm de largura e 8 a 20 µm de comprimento (Figura 7) e pode crescer em altas densidades celulares, facilitando o processo de colheita. A temperatura de crescimento ótimo está entre 18 °C e 22 °C, que é similar à média de temperatura anual em climas temperados (LEWIN *et al.* 1958; MANN e MYERS, 1968; KAIXIAN e BOROWITZKA, 1992; GRIMA *et al.*, 1997).

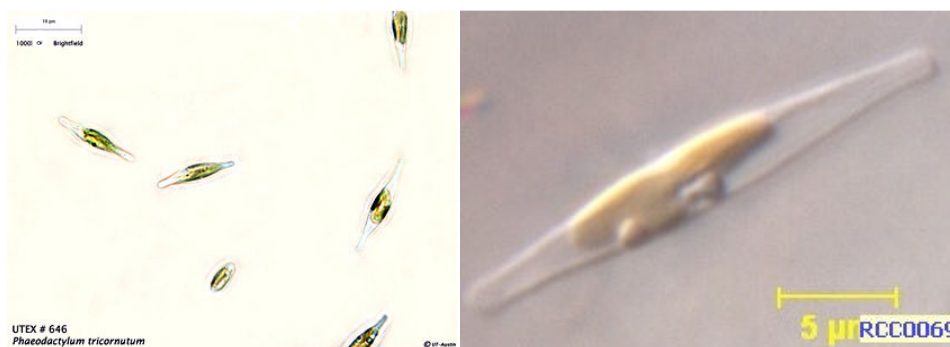


FIGURA 7 - CÉLULAS DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum*
 FONTE: RCC (2009); UTEX (2009)

Na Tabela 4 são apresentados um resumo de cultivos realizados com *P. tricornutum* e os resultados obtidos. Os experimentos foram feitos em diferentes condições de irradiância, fotoperíodo, temperatura, aeração, pH e tipo de biorreator, mas para cada experimento, a temperatura e irradiância foram mantidas constantes ao longo do cultivo. A maior produtividade de lipídeos, obtida até o momento em cultivo autotrófico, foi de 44,8 mg.L⁻¹.dia⁻¹ (RODOLFI *et al.* 2009) .

TABELA 4 – CULTIVOS AUTOTRÓFICOS REALIZADOS COM *Phaeodactylum tricornutum*

REATOR	REGIME DE OPERAÇÃO	MEIO DE CULTIVO	CONDIÇÕES			RESULTADOS					FONTE
			T (°C)	pH	FP (h)	Iluminação ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Aeração	Lipídeos (% de biomassa seca)	Lipídeos ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	Biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	
Foto-biorreator (220 L)	Contínuo	Mann e Myers	20	7,6 ^a	CC	CC	Ar atmosférico	17,9	nc	nc	FUENTES <i>et al.</i> (2001)
Foto-biorreator (57 L)	Batelada	Mann e Myers	20	7,6 ^a	CC	CC	Ar atmosférico	19,9	nc	0,20	FUENTES <i>et al.</i> (2001)
Erlenmeyer (250 mL)	Batelada	Guillard F/2	25	7,5 8,1	24	100	Ar atmosférico (5% CO ₂)	18,7	44,8	0,24	RODOLFI <i>et al.</i> (2009)

NOTA: T (temperatura); FP (fotoperíodo, luz); nc (não consta); CC (exposto às condições climáticas); ^a: o pH foi mantido através da injeção automática de CO₂

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação de mestrado é avaliar a produtividade de biomassa e de lipídeos, a partir de microalgas, em diferentes regimes de cultivo. Este projeto é motivado pela necessidade do desenvolvimento de novas fontes de lipídeos para obtenção de biodiesel, e vem a contribuir especificamente no estudo de métodos de obtenção e recuperação de biomassa e produção lipídica.

Os estudos aqui desenvolvidos envolvem inicialmente a avaliação das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*, com o intuito de escolher a espécie com maior produtividade volumétrica de lipídeo.

Durante a avaliação das microalgas tornou-se necessário padronizar os protocolos de recuperação de biomassa e lipídeos, isto justificado pela ausência de metodologias específicas adequadas para microalgas descritas da literatura.

Nas etapas seguintes, são iniciados os estudos com a microalga selecionada, *Phaeodactylum tricornutum*, em diferentes sistemas (erlenmeyers e minifotobiorreator) e condições de cultivo. Os cultivos em erlenmeyers têm como finalidade elucidar a produção de biomassa e lipídeos em diferentes regimes (batelada e semicontínuo) de cultivo em condições (temperatura, fotoperíodo, iluminação e concentração de inóculo) controladas.

Baseados nestas informações foram definidos (Figura 8) os objetivos específicos e as estratégias necessárias para alcançá-los.

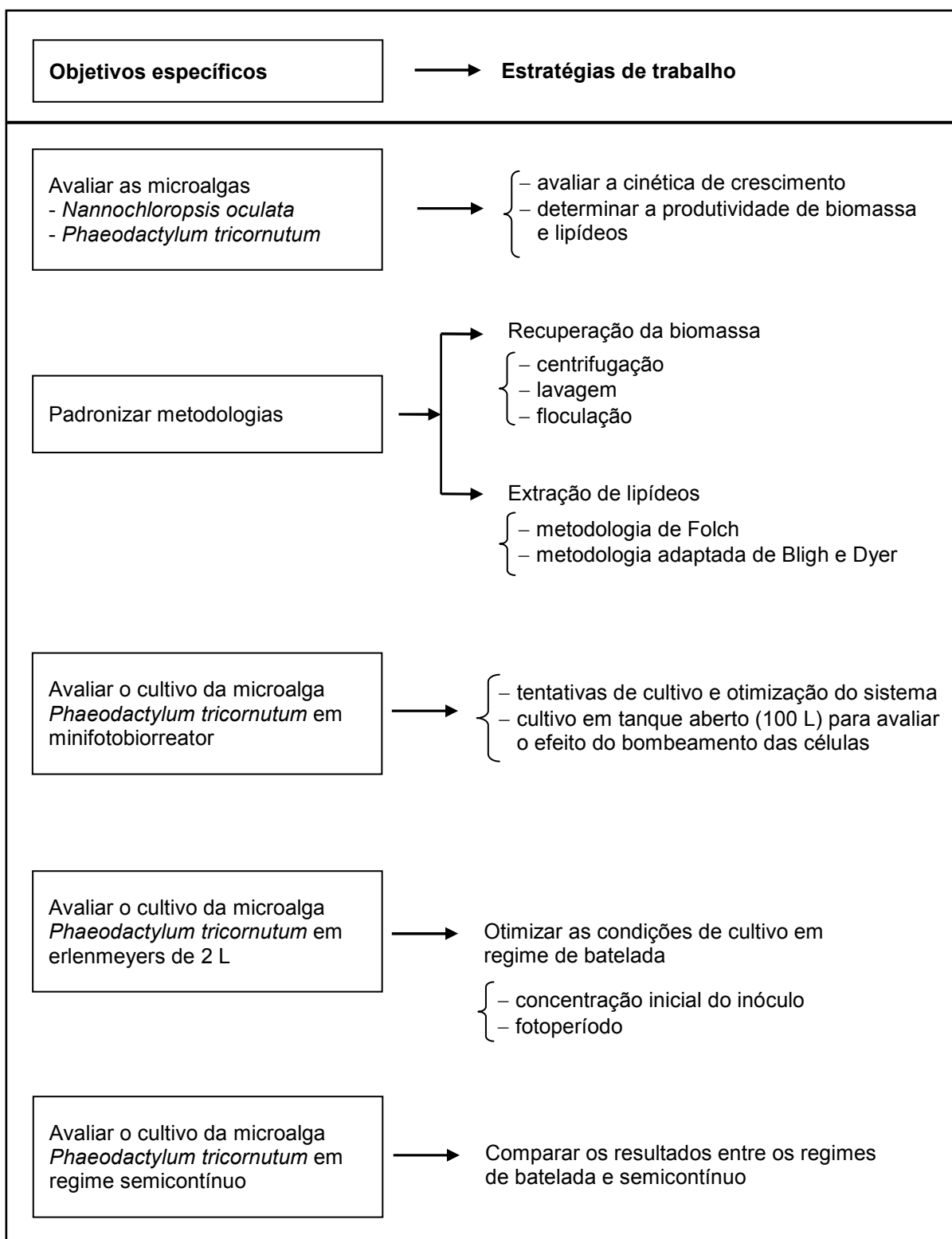


FIGURA 8 - FLUXOGRAMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICROALGAS

As cepas das microalgas marinhas *Phaeodactylum tricornutum* e *Nannochloropsis oculata* utilizadas neste trabalho foram provenientes da Coleção de Microalgas Elizabeth Aider, da Universidade Federal Fluminense (CMEA - UFF).

4.2 MEIO DE CULTIVO

As microalgas foram cultivadas no GIA em meio marinho Guillard F/2 (GUILLARD, 1975) modificado (Tabela 5). A água do mar utilizado nos cultivos era procedente do litoral do Paraná (Guaratuba) e foi previamente filtrada num conjunto de filtros de cartucho de celulose com porosidade decrescente (50, 5, 1 e 0,5 µm). Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de solução de hipoclorito de sódio (10 a 12% de cloro ativo) para cada litro de água do mar. A água do mar tratada foi armazenada por, no mínimo, 24 h antes do uso em tanques de fibra fechados com capacidade de 10.000 L.

A salinidade da água do mar armazenada nos tanques foi medida, com o auxílio de um refratômetro (Instrutherm RTS-28), e adaptada de acordo com a salinidade do meio de cultura de cada espécie. A microalga *Nannochloropsis oculata* foi cultivada em meio de cultivo com salinidade de 30 ‰ (partes por mil) e a microalga *Phaeodactylum tricornutum* foi adaptada para crescimento em meio de cultivo com salinidade de 15 ‰.

Os cultivos utilizados neste trabalho, foram feitos em erlenmeyers de 2 L, tanques de 100 L e em um minifotobiorreator com capacidade de 70 L. Os meios de cultivo com volume menor do que 2 L foram colocados em frascos de vidro (erlenmeyer) e fechados com papel alumínio. Os frascos, contendo meio de cultivo preparado, foram esterilizados em autoclave a 125 °C, numa pressão de 1,3 kgf/cm² por 30 minutos e, em seguida, foram aclimatados em sala climatizada a 20 ± 2 °C.

Nos cultivos com volume acima de 2 L, a água do mar (com salinidade ajustada) foi esterilizada adicionando-se 1,0 mL de solução de hipoclorito de sódio (10 a 12% de cloro ativo) para cada litro de água do mar preparada. Após 24 h de repouso, o cloro residual da água foi neutralizado com 1,0 mL de solução de tiosulfato de sódio (0,5 M) para cada litro de água do mar. A total neutralização do

cloro foi verificada com o kit comercial Clorotest (ácido clorídrico/ *orto*-toluidina) por metodologia colorimétrica onde a ausência de cor indica que não existe cloro no meio.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO GUILLARD F/2 MODIFICADO

PARA CADA 1 L DE ÁGUA DO MAR ADICIONOU-SE:

1,0 mL - Solução de Nitrato(N) e Fosfato(P)	
NaNO ₃	75,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	5,0 g
Água destilada	a 1,0 L
1,0 mL - Solução trabalho de metais	
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ ·2H ₂ O)	5,5 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4,0 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18 g
Solução estoque de metais	10,0 mL
Água destilada	a 1,0 L
onde a solução estoque de metais contém:	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,0 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,0 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,6 g
Água destilada	a 1,0 L
1,0 mL - Solução trabalho de vitaminas	
Solução estoque de vitaminas	2,0 mL
Água destilada	a 1,0 L
onde a solução estoque de vitaminas contém:	
Tiamina	50,0 g
Biotina	0,5 g
Cianocobalamina	0,5 g
Água destilada	a 1,0 L
0,75 mL - Solução de silicato	
Silicato de sódio alcalino	30,0 g
Água destilada	a 1,0 L
5,0 ml - Solução de TRIS	
TRIS (Tris Hidróximetil Amino Metano)	90,0 g
Ácido Clorídrico	60,0 mL
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18 g
Água destilada	850,0 mL

FONTE: GUILLARD (1975); GIA (2008)

4.2.1 Propagação dos cultivos

A propagação dos cultivos a partir dos tubos de ensaio foi feita por repicagens do inóculo, utilizando-se uma relação de 1:10 (inóculo:meio de cultivo esterilizado). O intervalo entre as repicagens após inoculação foi de três a quatro dias, com as células em fase exponencial de crescimento. A seqüência das repicagens foi feita em ordem crescente de volume de cultivo, conforme esquema da Figura 9.

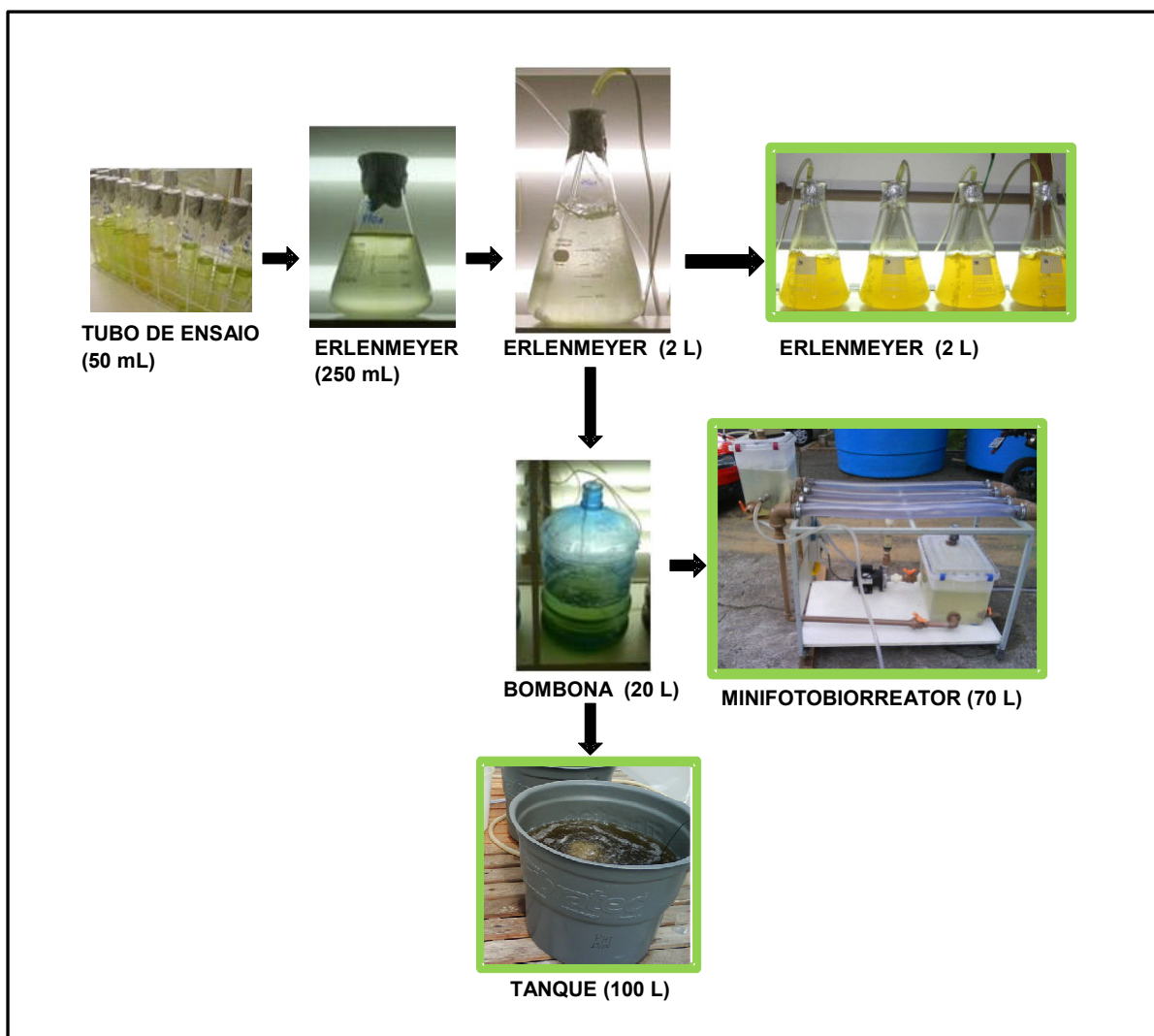


FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROPAGAÇÃO DE CULTIVOS
 FONTE: O AUTOR (2009)

4.3 CULTIVOS EM ERLENMEYERS

4.3.1 Condições de cultivo

O preparo do inóculo foi feito, de acordo com o protocolo descrito na seção 4.2, até alcançar o erlenmeyer com capacidade de 2 L, sendo que o volume de trabalho utilizado em cada erlenmeyer foi de 1,6 L. Os erlenmeyers contendo o meio de cultivo foram inoculados com 160 mL de inóculo e mantidos, na sala de cultivo do GIA, em temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. A iluminação foi obtida por lâmpadas fluorescentes tipo “luz do dia” de 40 W.

As culturas foram mantidas com agitação constante, por meio de aeração, com um fluxo de ar atmosférico (em cada erlenmeyer) de $2,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ distribuído por

um compressor (IBRAN) por meio de mangueiras de silicone conectadas a pipetas colocadas dentro dos frascos. O pH inicial dos meios de cultura foi de $7,6 \pm 0,1$.

4.3.2 Cultivo em regime de batelada

4.3.2.1 Cultivos preparados para caracterizar a cinética de crescimento

A caracterização da cinética de crescimento foi realizada para as microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*. Os cultivos foram realizados em triplicata, nas condições descritas na seção 4.3.1. Após inoculação, a densidade celular inicial da cultura de *N. oculata* foi de 30×10^4 células.mL⁻¹ e da cultura de *P. tricornutum* foi de 86×10^4 células.mL⁻¹. Durante o cultivo, foram coletados 2 mL de amostra, de cada erlenmeyer, diariamente, com o objetivo de determinar a densidade celular e avaliar a cinética de crescimento das células conforme protocolo 4.5. No oitavo dia de cultivo, na fase estacionária do ciclo de crescimento, foram coletados, de cada erlenmeyer, 1 L de amostra que, em seguida, foram centrifugadas para recuperação de biomassa e extração de lipídeos, conforme protocolos 4.6.1 e 4.7.1 respectivamente.

4.3.2.2 Cultivos preparados para verificar o efeito da concentração inicial de inóculo

Foram preparados cinco grupos de cultivos em duplicata da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, nas condições descritas na seção 4.3.1. Os erlenmeyers foram inoculados a partir de um mesmo inóculo com 854×10^4 células.mL⁻¹. No entanto, neste experimento foram preparados meios de cultura (N) com volume de trabalho de 1600 mL com diferentes densidades celulares iniciais:

- N1: meio de cultura feito a partir de 0,6% de inóculo;
- N2: meio de cultura feito a partir de 1,2% de inóculo;
- N3: meio de cultura feito a partir de 3,5% de inóculo;
- N4: meio de cultura feito a partir de 5,9% de inóculo;
- N5: meio de cultura feito a partir de 11,7% de inóculo.

Após o início do cultivo, foram coletados 2 mL de amostra, de cada erlenmeyer, diariamente, com o objetivo de determinar a densidade celular máxima

alcançada por cada grupo. No sétimo dia de cultivo, na fase estacionária do ciclo de crescimento foram coletados de cada erlenmeyer 300 mL de amostra para recuperação de biomassa e extração de lipídeos, conforme protocolos 4.6.3.2 e 4.7.1 respectivamente.

4.3.2.3 Cultivos preparados para verificar o efeito do fotoperíodo

Foram preparados dois grupos de cultivos em triplicata da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, nas condições descritas em 4.3.1. Todos os cultivos foram preparados com a mesma densidade celular inicial (42×10^4 células.mL⁻¹). Um grupo foi mantido em fotoperíodo de 12 h de luz e o outro em fotoperíodo de 24 h de luz. Durante o cultivo, foram coletados 2 mL de amostra, de cada erlenmeyer, diariamente, com o objetivo de determinar a densidade celular e avaliar a cinética de crescimento das células conforme protocolo 4.5. No décimo dia de cultivo, na fase estacionária do ciclo de crescimento, foram coletados, de cada grupo, 300 mL de amostra que, em seguida, foram centrifugadas para recuperação de biomassa e extração de lipídeos, conforme protocolos 4.6.3.2 e 4.7.1 respectivamente.

4.3.3 Cultivo em regime semicontínuo

Foram preparados quatro grupos de cultivos em duplicata da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, nas condições descritas em 4.3.1. Todos os cultivos foram preparados com a mesma densidade celular inicial (48×10^4 células.mL⁻¹) e com volume de trabalho de 1,7 L. Um grupo foi cultivado em regime de batelada e os outros grupos foram cultivados em regime de batelada até o final da fase exponencial do ciclo de crescimento, e em seguida foram submetidos a regime semicontínuo.

Durante o regime semicontínuo, um volume conhecido da cultura foi colhido, periodicamente, e substituído por meio de cultivo novo. Este procedimento foi denominado de substituição. Para avaliar o efeito do intervalo de tempo entre as substituições foram testados três diferentes regimes de operação. Os detalhes de cada regime estão descritos na seção 5.5.

A densidade celular foi determinada diariamente durante o cultivo em batelada e a cada colheita de cultura durante o regime semicontínuo. As

produtividades de biomassa e lipídeo foram determinadas a cada 42 h após o início do regime semicontínuo.

4.4 CULTIVOS EM MINIFOTOBIORREATOR

O minifotobiorreator testado neste trabalho (Figura 10) foi construído pelo NPDEAS. O sistema foi montado com duas caixas transparentes de plástico com volumes de 47 L (caixa inferior) e 23 L (caixa superior) e por quatro tubos de policloreto de vinila (PVC) transparentes, cada um com comprimento de 104 cm, diâmetro interno de 50,4 mm e espessura de parede de 3 mm. A movimentação da cultura foi feita inicialmente por uma bomba centrífuga e a aeração foi feita com um fluxo de ar atmosférico distribuído por um compressor por meio de uma mangueira de silicone conectada a uma pedra porosa (de aquário) colocada dentro da caixa superior. Para resfriar o sistema, foi instalada uma serpentina de alumínio, dentro da caixa superior, com oito espirais de 8,5 cm de diâmetro e comprimento total de 2,15 m. As extremidades da serpentina foram conectadas por mangueiras por onde circulava água da torneira com temperatura de 20 ± 2 °C. A torneira foi ligada somente quando a temperatura da cultura (monitorada durante o dia por um termômetro digital) ultrapassou 26 °C.

Antes de abastecer o minifotobiorreator com meio de cultivo, foi realizada a limpeza do sistema. Para isto foi adicionado no minifotobiorreator 55 L de solução de hipoclorito de sódio (0,4% de cloro ativo), que foi circulada no sistema por 24 h. O sistema foi então esvaziado, e enchido com 55 L de água potável, que foi mantida em circulação por 24 h, sendo então esvaziado.

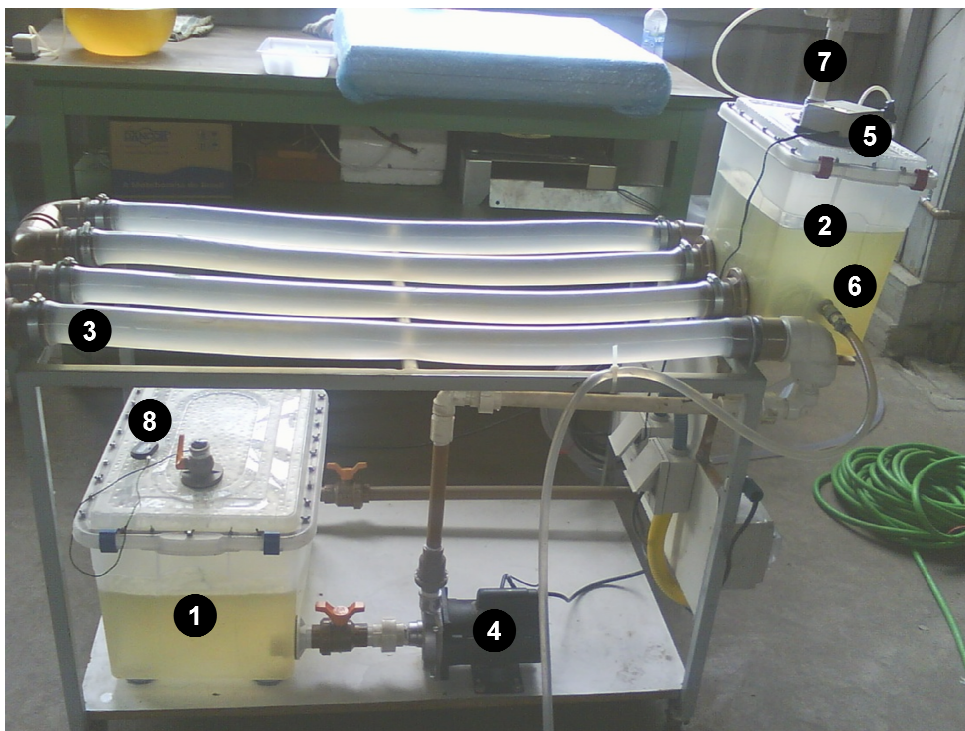


FIGURA 10 - MINIFOTOBIORREATOR EXPERIMENTAL

FONTE: O AUTOR (2009)

(1) Caixa inferior; (2) caixa superior (trocadora de gases); (3) tubos de PVC; (4) bomba centrífuga; (5) compressor de ar; (6) serpentina conectada a mangueira para resfriamento; (7) saída de gases; (8) termômetro digital.

O sistema foi instalado, próximo a uma janela, em ambiente sujeito a variações climáticas (temperatura, iluminação e fotoperíodo), dentro do Laboratório de Máquinas Hidráulicas (LMH) no campus Centro Politécnico na UFPR. O cultivo no minifotobiorreator foi feito com a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, sendo que o inóculo e o meio Guillard F/2 foram preparados no GIA de acordo com o protocolo descrito na seção 4.2. O minifotobiorreator foi então abastecido com 63 L de meio Guillard F/2 e inoculado com 7 L de inóculo previamente aclimatado. Após inoculação, o sistema (bomba centrífuga e compressor de ar) foi ligado.

O meio de cultura foi monitorado diariamente, durante o período das 8 às 18 h. Foram coletados 10 mL de amostra (três vezes ao dia) para medição de pH e contagem de células e, no mesmo momento da tomada de amostra a temperatura foi anotada. Na falta de um equipamento específico para medir a intensidade da luz incidida no minifotobiorreator, foram anotados o comportamento do clima do dia em relação à luminosidade (ensolarado, sol entre nuvens, nublado) e o fotoperíodo correspondente à época do cultivo.

Foram realizadas três tentativas de cultivo no minifotobiorreator com a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, sendo que a cada tentativa a bomba de movimentação (Figura 11) do meio de cultura foi substituída. As características de cada bomba utilizada foram:

- bomba B1: bomba centrífuga Schneider com carcaça de ferro fundido e rotor de bronze fechado, com potência de 0,25 CV e vazão de 30 L.min⁻¹;
- bomba B2: bomba centrífuga Dancor com carcaça de alumínio e rotor de plástico (PVC) fechado, com potência de 0,25 CV e vazão de 30 L.min⁻¹;
- bomba B3: eletrobomba de circulação com carcaça de plástico e rotor de pás de plástico semi-aberto (proveniente de uma máquina de lavar roupa), com frequência de 60 Hz e vazão de 15 L.min⁻¹.

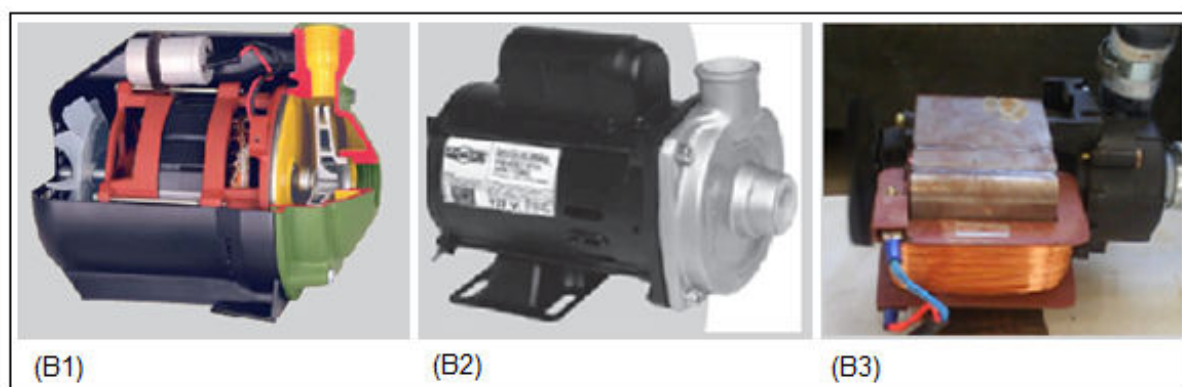


FIGURA 11 - MODELOS DE BOMBA DE MOVIMENTAÇÃO. (B1) BOMBA CENTRÍFUGA SCHNEIDER; (B2) BOMBA CENTRÍFUGA DANCOR; (B3) ELETROBOMBA DE CIRCULAÇÃO
 FONTE: FONTE: (B1) SCHNEIDER; (B2) DANCOR; (B3) O AUTOR (2009)

4.4.1 Teste com bomba centrífuga

Após a segunda tentativa de cultivo no minifotobiorreator, foi feito um experimento para testar o efeito do bombeamento (com a bomba centrífuga B2), do meio de cultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, na densidade celular. As culturas utilizadas neste experimento foram preparadas em dois tanques de fibra (Figura 12), sendo que cada tanque foi abastecido com 90 L de meio Guillard F/2 e inoculado com 10 L de inóculo, preparados de acordo com protocolo descrito na seção 4.2. Os tanques foram preparados no GIA e mantidos dentro de uma estufa plástica com teto e paredes transparentes, exposta a variações climáticas (temperatura, fotoperíodo, luminosidade).

As culturas foram mantidas com agitação constante por meio de aeração, com um fluxo de ar atmosférico distribuído por um compressor por meio de mangueiras de silicone conectadas a pedras porosas (de aquário) colocadas dentro dos tanques. A partir do segundo dia de cultivo, a cultura de um dos tanques foi bombeada (Figura 12), em um circuito de recirculação, cinco horas por dia, por seis dias consecutivos. Após início dos cultivos, foram coletados amostras de 2 mL, de cada cultura, diariamente, com o objetivo de determinar a densidade celular das culturas, conforme protocolo descrito em 4.5.



FIGURA 12 - CULTIVO EM TANQUES DE FIBRA PARA TESTE DE BOMBEAMENTO DO MEIO DE CULTURA COM BOMBA CENTRÍFUGA (B2)

4.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

As variações da densidade celular das microalgas, ao longo do desenvolvimento do cultivo, foram acompanhadas diariamente pela contagem de células em microscópio (aumento de 400×), com auxílio de uma câmara de Neubauer (*Improved Chamber*) de acordo com o protocolo de Vega e Voltolina (2007). A densidade celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (células.mL⁻¹) de uma média de três contagens. Com os dados experimentais de densidade celular, foram elaborados gráficos em função do tempo (dia).

4.5.1 Cinética de crescimento

Foram comparadas a equação logística e a equação exponencial, buscando a equação que melhor descrevesse o perfil experimental. As equações foram

ajustadas aos dados experimentais (de densidade celular) por regressão não linear, com auxílio do programa TK Solver 5.0, aplicando-se as equações 2 (exponencial) e 3 (logística), detalhadas a seguir:

$$N = N_0 \cdot e^{-\mu t} \quad \text{Eq. 2}$$

$$N = N_{\max} / [1 + (N_{\max} / N_0 - 1) \cdot \exp(-\mu t)] \quad \text{Eq. 3}$$

onde:

N = densidade celular (células.mL⁻¹);

N_0 = densidade celular inicial (células.mL⁻¹);

N_{\max} = densidade celular máxima (células.mL⁻¹);

μ = velocidade específica de crescimento (dia⁻¹);

t = tempo de cultivo (dias).

4.6 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

Foram testadas diferentes metodologias de recuperação da biomassa, sendo que as amostras testadas foram provenientes da mesma cultura microalgal de *Phaeodactylum tricornutum*, produzida de acordo com o procedimento descrito na seção 4.3.2.1. As amostras foram testadas em triplicata.

As metodologias, descritas a seguir, foram comparadas entre si e apenas uma foi escolhida para aplicação rotineira neste trabalho.

4.6.1 Centrifugação

Amostras de 100 mL de cultura microalgal foram coletadas e centrifugadas (Centrífuga HITACHI, modelo himac CR-21E) a 7000 rpm (3340 × g) por 20 min a 4 °C. Para cada amostra, o sobrenadante foi descartado e a biomassa úmida foi cuidadosamente transferida, com auxílio de uma pipeta Pasteur, para frascos de vidro pré-pesados. Os frascos contendo a biomassa microalgal foram congelados e, após total congelamento, liofilizados (Liofilizador Edwards –Modulyo) na pressão de 10⁻¹ mbar e temperatura do condensador de -40 °C para retirada da umidade da biomassa. Os frascos com a biomassa seca foram pesados e a quantidade de biomassa foi determinada em gramas de biomassa seca (liofilizada) por litro de cultura microalgal de acordo com a equação:

$$B_L = (P2 - P1) / V_{amostra} \quad \text{Eq. 4}$$

onde:

B_L = quantidade de biomassa seca por litro de cultura microalgal (g.L^{-1});

$P1$ = peso do frasco vazio (g);

$P2$ = peso do frasco + biomassa liofilizada (g);

$V_{amostra}$ = volume da amostra de cultura microalgal (L).

Para os cálculos de produtividade de biomassa foi usada a equação:

$$P_B = (B_i - B_0) / t_i \quad \text{Eq. 5}$$

onde:

P_B = produtividade de biomassa seca por litro de meio de cultura por dia ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$);

B_0 = quantidade de biomassa inicial (g.L^{-1});

B_i = quantidade de biomassa no tempo i (g.L^{-1});

t_i = intervalo de tempo (dia) entre B_0 e B_i (d^{-1}).

4.6.2 Lavagem da biomassa

A biomassa úmida, obtida conforme procedimento descrito na seção 4.6.1, foi submetida a quatro tratamentos diferentes:

- não lavada;
- lavada 1 × com 100 mL de água destilada;
- lavada 1 × com 100 mL de solução de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0,5 M;
- lavada 1 × com 100 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,15 M.

Depois de serem lavadas, as amostras, foram novamente centrifugadas e processadas, conforme procedimento descrito na seção 4.6.1, até a recuperação da biomassa lavada e liofilizada.

4.6.3 Floculação

4.6.3.1 Floculação com solução de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,3 M

Foram adicionados inicialmente 0,1 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para cada 100 mL de cultura, a uma concentração final de $\sim 0,3$ mM. A mistura foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro por dez segundos para formação de flocos (agregados de células). Nos casos onde não se observou a formação de flocos, adicionou-se mais 0,05 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, seguida de homogeneização até formação de flocos. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso para decantação das células. Após trinta minutos em repouso, o sobrenadante clarificado foi retirado e o restante da cultura contendo as células floculadas foi centrifugado, conforme procedimento descrito na seção 4.6.1.

4.6.3.2 Floculação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M

Foram adicionados inicialmente 0,5 mL de solução de NaOH 1 M para cada 100 mL de cultura, a uma concentração final de $\sim 5,0$ mM. A mistura foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro por dez segundos para formação de flocos. Nos casos onde não se observou a formação de flocos, adicionou-se mais 0,1 mL de solução de NaOH, seguida de homogeneização até formação de flocos. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso para decantação das células. Após trinta minutos em repouso, o sobrenadante clarificado foi retirado e o restante da cultura contendo as células floculadas foi centrifugado, conforme procedimento descrito na seção 4.6.1.

4.7 LIPÍDEOS TOTAIS

Foram testadas diferentes metodologias de extração dos lipídeos (totais) da biomassa (liofilizada) das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*. A biomassa das microalgas foi obtida de acordo com procedimento descrito na seção 4.6.1. As metodologias, descritas a seguir, foram comparadas entre si e apenas uma foi escolhida para aplicação rotineira neste trabalho.

4.7.1 Metodologia adaptada de Bligh e Dyer (1959)

A mistura de clorofórmio/metanol ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) utilizada nesta metodologia foi testada com duas proporções diferentes: ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; 1/2, v/v) e ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; 2/1, v/v).

Foram pesados 50 mg de amostra de microalga liofilizada em tubos de ensaio de polipropileno de 12 mL. Em seguida, adicionou-se 3 mL da mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ a ser testada e 10 μL de uma solução de butil hidróxi tolueno (BHT) (1% em metanol). A seguir, as amostras foram submetidas à ultrassom em um sonificador (USC 700, frequência 55 Hz) em banho de gelo por 3 ciclos de 15 min cada. Após o ultrassom, as amostras foram incubadas por 24 h a 4 °C e protegidas da luz (embrulhadas com papel alumínio para prevenir a fotooxidação das amostras) para posterior extração dos lipídeos.

As amostras foram submetidas à ultrassom novamente por três ciclos de 15 min cada e centrifugadas (Centrífuga HITACHI, modelo himac CR-21E) a 4000 rpm ($1910 \times g$) por 10 min a 4 °C; o sobrenadante com a fase lipídica foi recuperado com uma pipeta Pasteur e reservado em outro tubo. Adicionou-se 1,5 mL da mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ a ser testada ao tubo com a biomassa residual e centrifugou-se novamente a 4000 rpm ($1910 \times g$) por 10 min a 4 °C, sendo que o sobrenadante foi recuperado com uma pipeta Pasteur e transferido ao tubo reservado com a fase lipídica. Foram adicionados 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio ao tubo reservado, as amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm ($1910 \times g$) por 10 min a 4 °C. Em seguida, a fase inferior (clorofórmio:lipídeo) foi recuperada, com uma pipeta Pasteur, e transferida para um frasco (F1) de vidro pré-pesado. A fase aquosa foi lavada com 1 mL de clorofórmio e centrifugada novamente a 4000 rpm ($1910 \times g$) por 10 min a 4 °C. Então, a fase inferior foi recuperada e transferida para o frasco (F1) de vidro. O frasco de vidro foi levado a uma câmara de exaustão de gases, onde o clorofórmio da fase clorofórmio:lipídeo foi evaporado. Então, o frasco (F2) com a fração lipídica foi pesado e a quantidade de lipídeos totais foi determinada em % (L_B) de biomassa seca e em miligramas de lipídeo por litro de cultura microalgal (L_C) de acordo com as equações:

$$L_B = (F2 - F1) \times 100\% / P_{\text{amostra}} \quad \text{Eq. 6}$$

$$L_C = L_B \times B_L / 100\% \quad \text{Eq. 7}$$

onde:

L_B = lipídeos totais (em % de biomassa liofilizada);

L_C = lipídeos totais (em mg por litro de cultura microalgal);

$F1$ = peso do frasco vazio (mg) ;

$F2$ = peso do frasco + lipídeos totais (mg);

P_{amostra} = quantidade de amostra de biomassa liofilizada (mg);

B_L = quantidade de biomassa seca por litro de cultura microalgal (mg.L^{-1}).

Para os cálculos de produtividade de lipídeo foi usada a equação:

$$P_L = (L_{Ci} - L_{Co}) / t_i \quad \text{Eq. 8}$$

onde:

P_L = produtividade de lipídeo por litro de meio de cultura por dia ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$);

L_{Co} = quantidade de lipídeo inicial (mg.L^{-1});

L_{Ci} = quantidade de lipídeo no tempo i (mg.L^{-1});

t_i = intervalo de tempo (dia) entre L_{Co} e L_{Ci} (d^{-1}).

4.7.2 Método de Folch *et al.* (1957)

Foram pesados 50 mg de amostra de microalga liofilizada em tubos de ensaio de polipropileno de 50 mL, e adicionou-se 10 mL de uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1, v/v) aos tubos. As amostras foram então trituradas em um homogeneizador (Van Potter Elvehøyen) em velocidade média por 5 min. Após trituração, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga HITACHI, modelo himac CR-21E) a 4000 rpm ($1910 \times g$) por 8 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma proveta graduada com tampa, e adicionado 2,5 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) 0,1 M. O sistema foi manualmente agitado, invertendo-se com cuidado as posições da boca e da base por três vezes; em seguida aguardou-se alguns minutos, sendo observada a formação de duas fases: a superior, incolor e composta por água, metanol e compostos hidrofílicos e a inferior com lipídeos dissolvidos em clorofórmio. Assim que as duas fases se separaram

completamente, a fase superior foi removida com uma pipeta Pasteur, transferida a um tubo e reservada. Adicionou-se à solução remanescente (proveta) 1,5 mL de uma mistura de metanol/água (1/1, v/v).

O sistema foi agitado cuidadosamente e mantido em repouso até separação das fases, então a fase superior foi removida com pipeta Pasteur e transferida ao tubo reservado. A fase inferior (tubo) foi filtrada em papel filtro qualitativo (12 cm de diâmetro) preenchido com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro. O filtrado foi recolhido em balão de vidro com boca esmerilhada. As amostras foram evaporadas em um evaporador rotativo a 40 °C, e em seguida foram solubilizadas com 5,0 mL de clorofórmio e transferidas para um frasco de vidro pré-pesado. O frasco de vidro foi levado a uma câmara de exaustão de gases, onde o clorofórmio da fase clorofórmio:lipídeo foi evaporado. A quantificação de lipídeos foi feita de acordo com as equações 7 e 8, utilizadas na seção 4.7.1.

4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Os valores de densidade celular, biomassa e lipídeos apresentados neste trabalho são médias dos resultados (de três amostras) seguida do erro padrão das amostras:

$$s = \sqrt{\sum (x_i - x')^2 / (n - 1)} \quad \text{Eq. 9}$$

onde:

s = erro padrão das amostras;

x_i = valor de cada resultado individual (x_1, x_2, x_3);

x' = média aritmética dos valores x_i ;

n = número de amostras;

Para comparar se duas amostras apresentavam diferenças significativas entre si, foi aplicado o teste t, com o auxílio das ferramentas de análise do Excell, com nível de significância de 5%, onde:

- $p > 0,05$ significa que não houve diferença significativa entre a média das amostras;
- $p < 0,05$ significa que houve diferença significativa entre a média das amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados em cinco seções. A primeira trata da avaliação das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum* para caracterizar a cinética de crescimento e a produção de biomassa e lipídeos, visando escolher uma das espécies para utilizar neste trabalho. Na segunda seção são relatados os experimentos necessários para definir uma metodologia de recuperação de biomassa do meio de cultura microalgal e uma metodologia de extração de lipídeos totais da biomassa seca de microalgas. A terceira seção trata da avaliação do cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em um minifotobiorreator (escala piloto) e do efeito do bombeamento do meio de cultura na produção celular. Nas seções (4 e 5) seguintes são avaliados diferentes experimentos com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* cultivada em erlenmeyers em ambiente com condições (temperatura, iluminação e fotoperíodo) controladas. Na quarta seção os cultivos são feitos em regime de batelada e na quinta seção em regime semicontínuo.

5.1 AVALIAÇÃO DAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* E *Phaeodactylum tricornutum*

De acordo com a literatura, as microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum* apresentaram diferentes resultados de produtividade de biomassa e lipídeos, conforme relatado nas Tabelas 3 e 4. No entanto, devido às diferentes condições de cultivo (regime, temperatura, fotoperíodo, iluminação) e diferentes metodologias de avaliação (biomassa e lipídeos) utilizadas nos experimentos, foi necessário fazer uma comparação das microalgas *N. oculata* e *P. tricornutum* sob condições iguais de crescimento, para escolher a microalga a ser utilizada nas etapas futuras deste trabalho. Esse estudo foi subdividido em duas etapas: caracterização da cinética de crescimento e produção de biomassa e lipídeos das microalgas.

5.1.1 Caracterização da cinética de crescimento

O crescimento das microalgas foi avaliado pela determinação da densidade celular em função do tempo (dia). Foram levantadas curvas de crescimento das duas microalgas. Então, foram determinadas a densidade celular máxima e a velocidade específica de crescimento a partir de uma equação cinética ajustada aos dados.

A densidade celular foi determinada uma vez ao dia durante nove dias de cultivo, conforme procedimento descrito na seção 4.5. Os cultivos das duas espécies foram realizados em erlenmeyers nas mesmas condições (temperatura, iluminação e fotoperíodo) conforme descrito na seção 4.3.2.1.

Foram ajustadas duas equações cinéticas (exponencial e logística) aos dados de densidade celular visando selecionar a equação que melhor descrevesse o perfil de crescimento, conforme descrito na seção 4.5.1. O crescimento foi exponencial somente até o quarto dia de cultivo para *N. oculata* (Figura 13A) e somente até o terceiro dia de cultivo para *P. tricornutum* (Figura 13B).

A equação logística se ajustou bem aos dados (Figura 13) das duas espécies de microalgas até o último dia de cultivo avaliado, onde as culturas estavam na fase estacionária do ciclo de crescimento. Assim, a equação logística foi escolhida para aplicação na avaliação rotineira do crescimento celular microalgal.

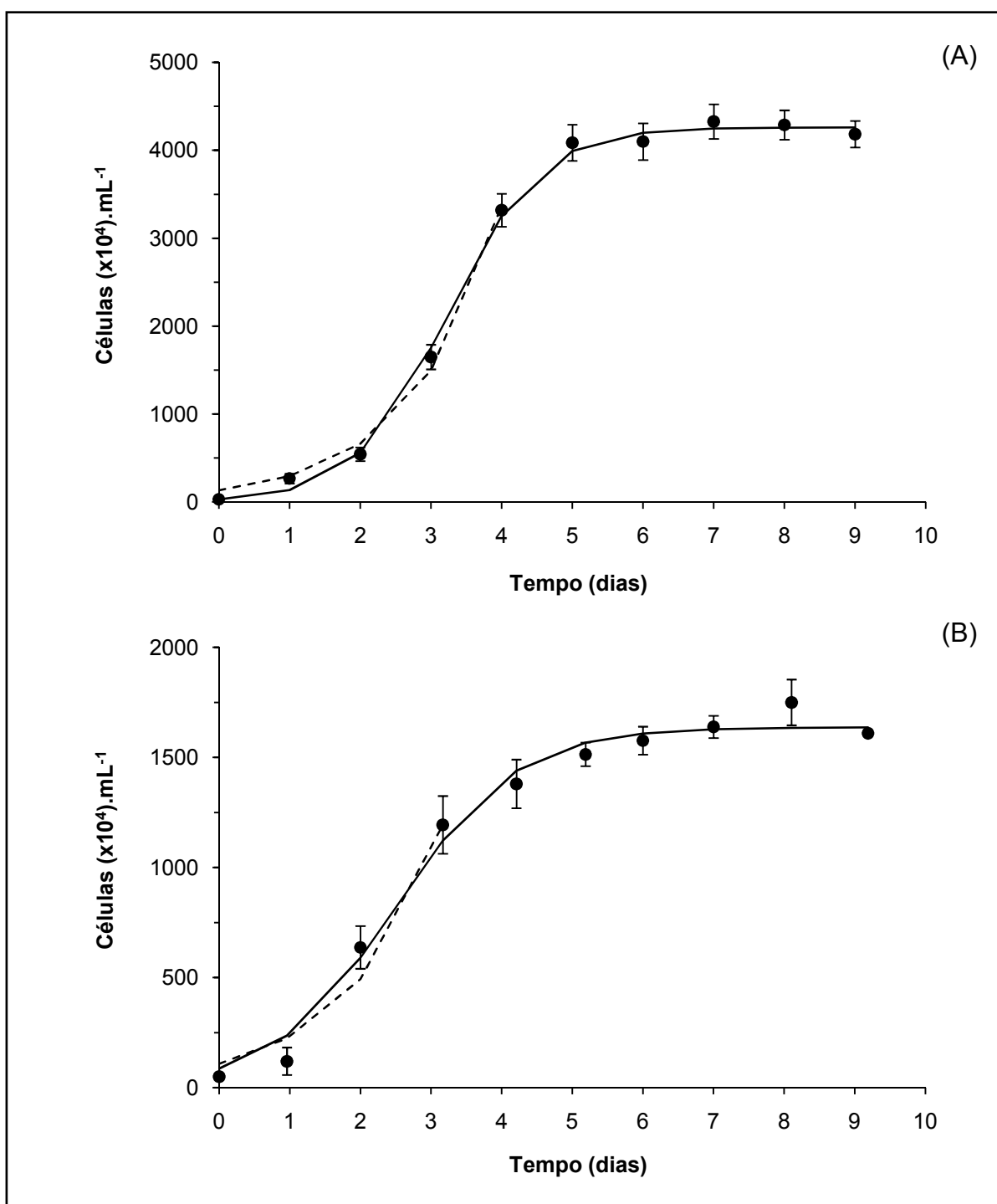


FIGURA 13 - CURVA DE CRESCIMENTO DAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* (A) E *Phaeodactylum tricornutum* (B), MOSTRANDO OS AJUSTES DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA (—) E EXPONENCIAL (- - -) AOS DADOS (•). As barras verticais representam o erro padrão (n = 3) (seção 4.8).

A Tabela 6 mostra os resultados da análise cinética do crescimento das microalgas *N. oculata* e *P. tricornutum* obtidos pelo ajuste da equação logística aos dados, com o auxílio do programa TK Solver 5.0.

TABELA 6 - ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* E *Phaeodactylum tricornutum* PELO AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA

Parâmetros	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
N_0 ($\times 10^4$ células.mL ⁻¹)	30	86
$N_{\text{máx}}$ ($\times 10^4$ células.mL ⁻¹)	4261	1637
$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	1,53	1,16
Intervalo (dia)	0 - 9	0 - 9

N_0 : densidade celular inicial; $N_{\text{máx}}$: densidade celular máxima; μ : velocidade específica de crescimento

A densidade celular máxima alcançada, no quinto dia de cultivo, pela cultura da microalga *N. oculata*, foi 2,6 vezes maior do que a densidade celular máxima da cultura da *P. tricornutum*, alcançada no sexto dia de cultivo. No entanto, isto não significa que a quantidade de biomassa produzida pela *N. oculata* é maior do que a biomassa da *P. tricornutum*, pois trata-se duas espécies diferentes de microalgas. De acordo com a revisão bibliográfica (seção 2.6), as células da microalga *N. oculata* são menores do que as células da *P. tricornutum*.

Estes resultados ainda não são suficientes para definir a microalga mais adequada para este trabalho, no entanto, este experimento foi importante para verificar as diferentes fases de crescimento e o tempo que cada cultura leva para atingir densidade celular máxima. Além disso, a equação logística foi escolhida para avaliação rotineira nos experimentos futuros.

5.1.2 Produtividade de biomassa e lipídeos

A avaliação da produtividade de biomassa e lipídeos (Tabela 7) das microalgas *N. oculata* e *P. tricornutum* foram definitivas na escolha da microalga. Foram coletados no oitavo dia, quando as culturas já estavam na fase estacionária do ciclo de crescimento, 300 mL de meio de cultura de cada microalga. Em seguida a biomassa foi recuperada e quantificada de acordo com procedimento descrito na seção 4.6.1. Os lipídeos totais foram extraídos e quantificados com a metodologia adaptada de Bligh e Dyer, na proporção de (CHCl₃/CH₃OH; 2/1, v/v) conforme procedimento descrito na seção 4.7.1.

A Tabela 7 mostra as produtividades volumétricas de biomassa e lipídeos das duas microalgas. A produtividade volumétrica de biomassa seca para *N. oculata* foi 1,5 vezes maior do que a da biomassa seca para *P. tricornutum*. No entanto, a

produtividade volumétrica de lipídeos para *P. tricornutum* foi 1,3 vezes maior do que aquela para *N. oculata*. O melhor desempenho da *P. tricornutum* com relação à produtividade de lipídeos se deve ao fato que o percentual lipídico de sua biomassa é 1,9 vezes maior do que aquela para *N. oculata*.

TABELA 7 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* E *Phaeodactylum tricornutum*

Parâmetros	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Amostragem (dias de cultivo)	8	8
N ($\times 10^4$ células.mL ⁻¹)	4193 \pm 167	1716 \pm 104
P _B (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	0,17 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
Lipídeos (% de biomassa seca)	8,9 \pm 0,1	17,0 \pm 1,1
P _L (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	14,9 \pm 0,2	19,3 \pm 0,9

N: densidade celular; P_B: produtividade de biomassa; P_L: produtividade de lipídeos. Os resultados mostrados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão (seção 4.8).

Visto que um dos objetivos deste trabalho é escolher a espécie com maior produtividade lipídica por litro de meio de cultura, foi escolhida então a microalga *Phaeodactylum tricornutum*. O percentual lipídico de 17,0 \pm 1,1 obtido neste trabalho para a microalga escolhida foi similar aos percentuais encontrados na literatura (FUENTES *et al.*, 2001; RODOLFI *et. al.*, 2009).

5.2 AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS

Foram encontrados na literatura diferentes métodos de recuperação de biomassa e extração de lipídeos de microalgas, o que dificulta a comparação entre resultados obtidos por autores diferentes. Diante disto, foi necessário inicialmente testar algumas metodologias para definir a melhor opção para aplicação rotineira neste trabalho.

5.2.1 Recuperação da biomassa

A recuperação da biomassa é uma das etapas mais importantes no processamento de uma cultura de microalgas, pois a partir da biomassa são extraídos os lipídeos. A biomassa microalgal pode ser recuperada de diferentes formas, conforme relatado na seção 2.4. Nesta seção foram comparadas diferentes

metodologias de recuperação de biomassa da cultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Dentre as diversas metodologias de recuperação encontradas na literatura foram testadas a centrifugação e a floculação.

Segundo Zhu e Lee (1997), a biomassa seca determinada na análise de amostras de microalgas marinhas é afetada pela quantidade de sal presente no meio. Alguns trabalhos descritos na literatura não mencionam ou não fazem nenhum passo de lavagem (GONZÁLEZ *et al.*, 1998; RODOLFI *et al.*, 2009). Outros usam diferentes soluções de lavagem (FUENTES *et al.*, 2001; GRIMA *et al.*, 2001). Não foram encontrados na literatura estudos que demonstrem a influência da lavagem no teor lipídico da biomassa. Assim, neste trabalho foram avaliados os efeitos da floculação na recuperação da biomassa e da lavagem da biomassa frente a diferentes soluções no teor lipídico obtido em miligramas por litro de meio de cultura.

5.2.1.1 Efeito do tratamento de lavagem da biomassa úmida na recuperação de biomassa e lipídeos de microalgas

Para avaliar o efeito dos tratamentos de lavagem na obtenção de biomassa e lipídeos da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, as amostras de biomassa úmida foram submetidas a quatro tratamentos de recuperação diferentes: sem lavagem; lavagem com água destilada; lavagem com solução de NH_4HCO_3 (0,5 M); lavagem com solução de NaCl (0,15 M), conforme descrito na seção 4.6.2. Os resultados de biomassa seca (Figura 14) das amostras lavadas foram comparados com o resultado da amostra sem lavar através do teste t com nível de significância de 5% conforme descrito na seção 4.8.

As amostras tratadas com diferentes agentes de lavagem apresentaram resultados de biomassa seca significativamente menores ($p < 0,05$) em relação à amostra não lavada. A média de biomassa seca da amostra não lavada foi 2,8 vezes maior do que a lavada com água destilada, 1,5 vezes maior do que a lavada com solução de NH_4HCO_3 e 1,6 vezes maior do que a lavada com NaCl. Zhu e Lee (1997) avaliaram o efeito da lavagem de cinco espécies diferentes de microalgas com as mesmas soluções de lavagem utilizadas neste trabalho. A média da biomassa seca das amostras não lavadas também foram maiores comparadas com as amostras lavadas. Estes estudos sugerem que a lavagem diminui a quantidade

de biomassa determinada, no entanto isto não significa que houve perda de células, e sim perda de sais que não foram totalmente removidos com a centrifugação.

A quantidade de biomassa foi significativamente menor ($p < 0,05$) para a amostra lavada com água destilada em relação às amostras lavadas com a solução de NH_4HCO_3 (0,5 M) ou NaCl (0,15 M) (Figura 14A). Pelo fato da microalga *P. tricornutum* ser marinha, supõe-se que as células podem ter sido rompidas pela ação da pressão osmótica com a adição de água destilada, explicando assim os baixos valores de biomassa obtidos nas amostras lavadas com água destilada. No entanto, não foram encontradas outras evidências que comprovassem a ocorrência de lise celular.

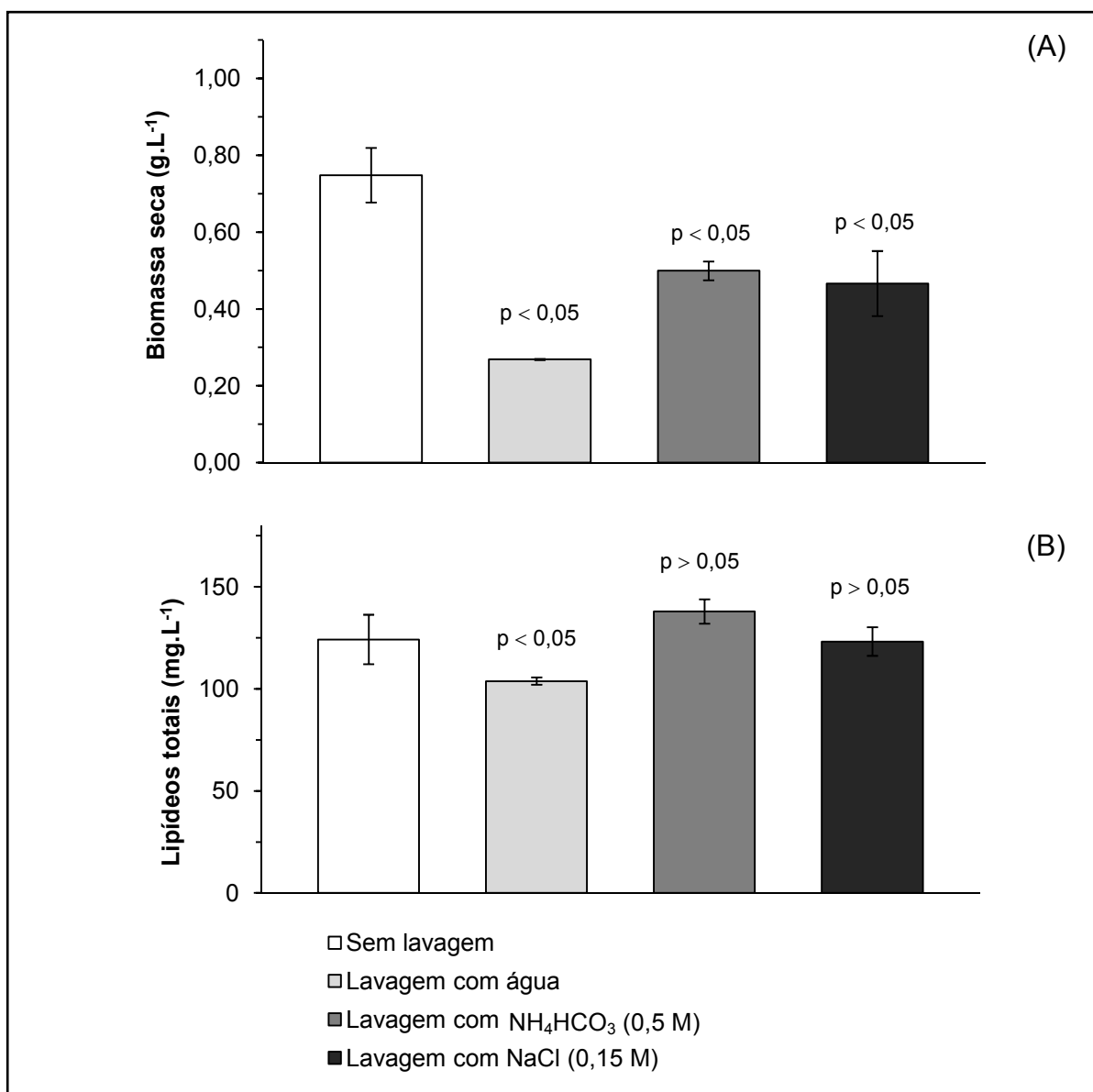


FIGURA 14 - RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA (A) E LIPÍDEOS (B) DA MICROALGA *P. tricornutum* EM QUATRO TRATAMENTOS DIFERENTES DE LAVAGEM DA BIOMASSA ÚMIDA. As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8).

Para avaliar o efeito dos tratamentos de lavagem no teor de lipídeos extraídos da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, foram avaliados o teor lipídico da biomassa seca obtida após cada tratamento, com a metodologia adaptada de Bligh e Dyer, na proporção de ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; 2/1, v/v) conforme procedimento descrito na seção 4.7.1. Os resultados (Figura 14B) dos teores lipídicos obtidos das amostras de biomassa lavadas foram comparados com o resultado da amostra sem lavar através do teste t com nível de significância de 5%.

A Figura 14B mostra que houve diferença significativa na quantidade de lipídeos extraídos apenas com a amostra lavada com água destilada. A quantidade de lipídeos da amostra lavada com água foi 1,2 vezes menor do que a amostra não lavada. Este resultado indica que durante o processo de lavagem com água destilada houve perda de células. Este fato decorre da isotonicidade proporcionada pela solução de bicarbonato de amônio (evitando rompimento das células) e sua fácil remoção por evaporação a 60 °C (ZHU; LEE, 1997).

Apesar de alguns autores utilizarem a lavagem da biomassa, nenhum mostrou a influência da lavagem na recuperação de lipídeos (ZHU; LEE, 1997; FUENTES *et al.*, 2001; GRIMA *et al.*, 2001). Apenas foi constatada a influência na recuperação de biomassa que diminui com a lavagem (ZHU; LEE, 1997). Mas como o objetivo deste trabalho são os lipídeos e visto que na ausência do processo de lavagem não houve prejuízo no teor lipídico, não foi feito nenhum tratamento de lavagem da biomassa úmida nas etapas seguintes deste trabalho.

5.2.1.2 Efeito da floculação da cultura na recuperação de biomassa e lipídeos de microalgas

A finalidade deste estudo foi de avaliar o efeito de agentes flocculantes na recuperação de biomassa e lipídeos da microalga *P. tricornutum*. A floculação auxilia na redução do volume a ser centrifugado e conseqüentemente reduz os custos de recuperação, visto que a floculação é um processo mais econômico do que a centrifugação. Os agentes flocculantes testados foram uma solução de base forte (NaOH) e uma solução de um sal catiônico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

A biomassa seca determinada das culturas floculadas com solução de NaOH 1 M foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação às amostras não floculadas (Figura 15A). O aumento da massa das amostras floculadas com solução de NaOH

é devido ao fato de que parte do NaOH é agregado à biomassa, mesmo após centrifugação e lavagem.

A floculação da cultura com solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,3 M (Figura 15A) deu um resultado diferente. Neste caso, as amostras não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação às amostras sem flocular, indicando que este floculante não deixou resíduos após centrifugação. Isto pode ter ocorrido porque a quantidade de FeCl_3 (gramas por litro de cultura) adicionado ao meio de cultura foi quatro vezes menor que a quantidade de NaOH (gramas por litro de cultura) para promover a floculação. Provavelmente, a quantidade de resíduos da solução de FeCl_3 não foi significativa para aumentar a biomassa.

Os teores de lipídeos (Figura 15B) das amostras floculadas com solução de NaOH e com solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação às amostras sem flocular, indicando que os dois procedimentos podem ser utilizados para flocular o meio de cultura e reduzir os volumes a serem processados. No entanto, o custo para a floculação de um mesmo volume de meio de cultura utilizando o agente floculante NaOH é 60% mais barato do que quando utilizado o agente floculante $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Além disso, no experimento realizado por Horiuchi *et al.* (2003), o meio de cultura clarificado após floculação com NaOH foi reutilizado, depois da adição de uma solução de HCl para ajustar o pH. Após clarificação e neutralização do meio, nenhum inóculo foi empregado, e as células remanescentes voltaram a se multiplicar. Este resultado sugere que as células após floculação não são seriamente danificadas pelo tratamento alcalino. Para o presente trabalho optou-se pela utilização da floculação, do meio de cultura, com solução de NaOH (1 M), visto que este processo foi eficiente e econômico. Além disso, o baixo custo deste procedimento faz com que seja apropriado para aplicação em grande escala.

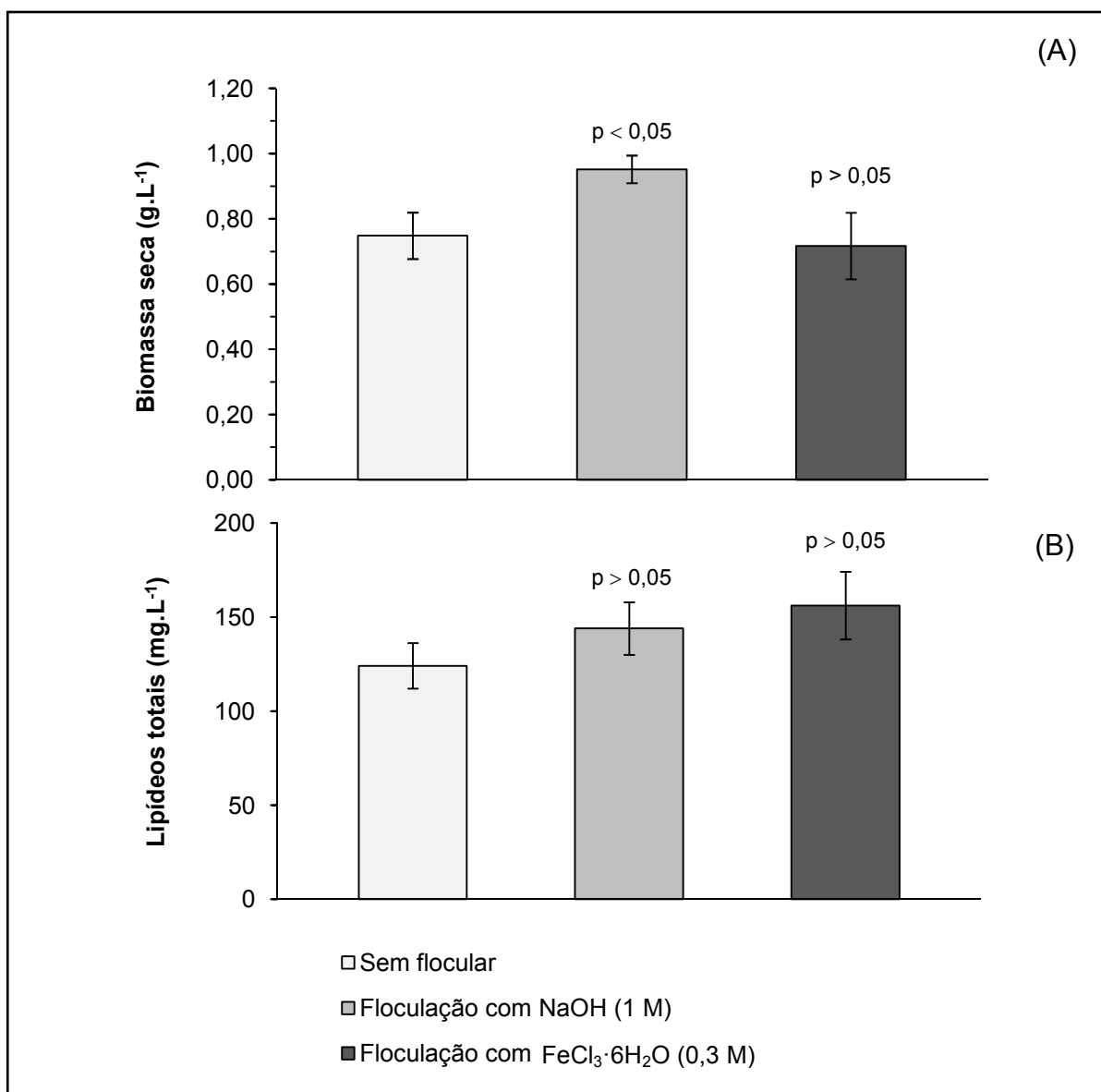


FIGURA 15 - RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA (A) E LIPÍDEOS (B) DA MICROALGA *P. tricornutum* EM TRÊS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DIFERENTES

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8).

5.2.2 Extração de lipídeos totais

A maior parte das metodologias destinadas à extração de lipídeos totais são adaptações dos métodos desenvolvidos por Bligh e Dyer (1959) e Folch *et al.* (1957). Estas metodologias baseiam-se na utilização de uma mistura monofásica de clorofórmio, metanol e água ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$). Para este trabalho foram testadas adaptações (seção 4.7) destas metodologias, sendo estas apropriadas à extração de lipídeos a partir de pequenas quantidades (miligramas) de biomassa seca.

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos pelas metodologias adaptadas de Bligh e Dyer

e Folch *et al.* No caso da *N. oculata* o método de Bligh e Dyer resultou um teor de lipídeos 71% maior do que o teor dado pelo método de Folch. No caso da *P. tricornutum* o método de Bligh e Dyer resultou um teor de lipídeos 117% maior do que o teor dado pelo método de Folch. Ao mudar apenas a proporção de solvente no método adaptado de Bligh e Dyer, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados. Pode-se concluir que, para este caso, a proporção do solvente não influenciou tanto quanto a metodologia, pois apesar de a metodologia adaptada de Folch utilizar as mesmas proporções de solvente da metodologia adaptada de Bligh e Dyer, na proporção de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1, v/v), os teores de lipídeos obtidos foram significativamente menores.

TABELA 8 - TEOR TOTAL DE LIPÍDEOS (EM % DE BIOMASSA SECA) DAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* E *Phaeodactylum tricornutum* EXTRAÍDOS POR DIFERENTES METODOLOGIAS

Metodologia	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Bligh e Dyer - $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/2, v/v)	8,13 ± 0,07	14,85 ± 0,53
Bligh e Dyer - $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1, v/v)	8,87 ± 0,08	16,97 ± 0,63
Folch <i>et al.</i> - $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1, v/v)	5,20 ± 0,11	7,82 ± 0,44

Os resultados correspondem à média de três amostras seguidas do erro padrão (seção 4.8).

Para este trabalho, a metodologia mais adequada foi a adaptada de Bligh e Dyer nas proporções de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1, v/v), que foi escolhida para aplicação rotineira neste trabalho. Além disso, é importante observar que apesar das diferentes características morfológicas das microalgas estudadas, a metodologia de Bligh e Dyer foi a que obteve maior teor de lipídeos para as duas espécies analisadas.

5.3 CULTIVO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM MINIFOTOBIORREATOR

De acordo com a literatura, as microalgas têm sido cultivadas em diferentes sistemas de cultivo e em diferentes condições de temperatura, fotoperíodo e iluminação. Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o crescimento de microalgas em um minifotobiorreator, onde seriam testados diferentes regimes de cultivo.

Foram realizadas três tentativas de cultivo no minifotobiorreator com a microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Inicialmente, a agitação da cultura no minifotobiorreator foi feita pela bomba centrífuga B1 (Schneider) com carcaça de

ferro fundido e rotor de bronze fechado. Após abastecimento do minifotobiorreator com meio de cultivo e inóculo, foi iniciado o monitoramento (conforme descrito na seção 4.4) do pH, densidade celular (Figura 16A), temperatura da cultura e variações climáticas (Figura 16B).

O pH inicial do meio de cultura foi de $7,6 \pm 0,1$ e manteve-se na faixa de $7,6 \pm 0,1$ a $7,8 \pm 0,1$ ao longo do cultivo. O fotoperíodo referente ao mês do experimento (março) foi de 12,2 h de luz.

A densidade celular foi diminuindo diariamente, de um valor inicial de $(42 \pm 4) \times 10^4$ células.mL⁻¹, sendo o experimento encerrado no quarto dia, com densidade celular final de $(4 \pm 2) \times 10^4$ células.mL⁻¹ (Figura 16A). Além disso, no segundo dia o meio de cultura apresentou uma coloração anormal. No início a cultura estava levemente marrom claro (translúcido), e mudou para amarelo translúcido. Esta coloração anormal já tinha sido observada durante a limpeza do sistema, quando o minifotobiorreator foi abastecido com água potável, que foi mantida em circulação com a bomba por 24 h. Suspeitou-se que a variação observada na coloração pode ter sido causada pela oxidação do ferro presente na bomba B1.

A temperatura (Figura 16B) inicial do meio de cultura foi de 24 °C, e subiu rapidamente após o início da circulação do meio com a bomba. Notou-se que a carcaça da bomba sofreu um rápido aquecimento, transferindo o calor para o meio de cultura, sendo que em apenas quinze minutos de circulação, a temperatura subiu 3 °C. Devido ao aquecimento provocado pela bomba, optou-se por circular água da torneira pela serpentina continuamente. No entanto, mesmo após ligação do sistema de refrigeração, as temperaturas registradas foram maiores que 26 °C. Na primeira noite, a mangueira por onde a serpentina era alimentada desconectou-se acidentalmente e a temperatura registrada pela manhã do dia seguinte foi de 33,4 °C (Figura 16B). A mangueira foi então reconectada, o que provocou a diminuição da temperatura, a qual manteve-se entre 27 e 30 °C.

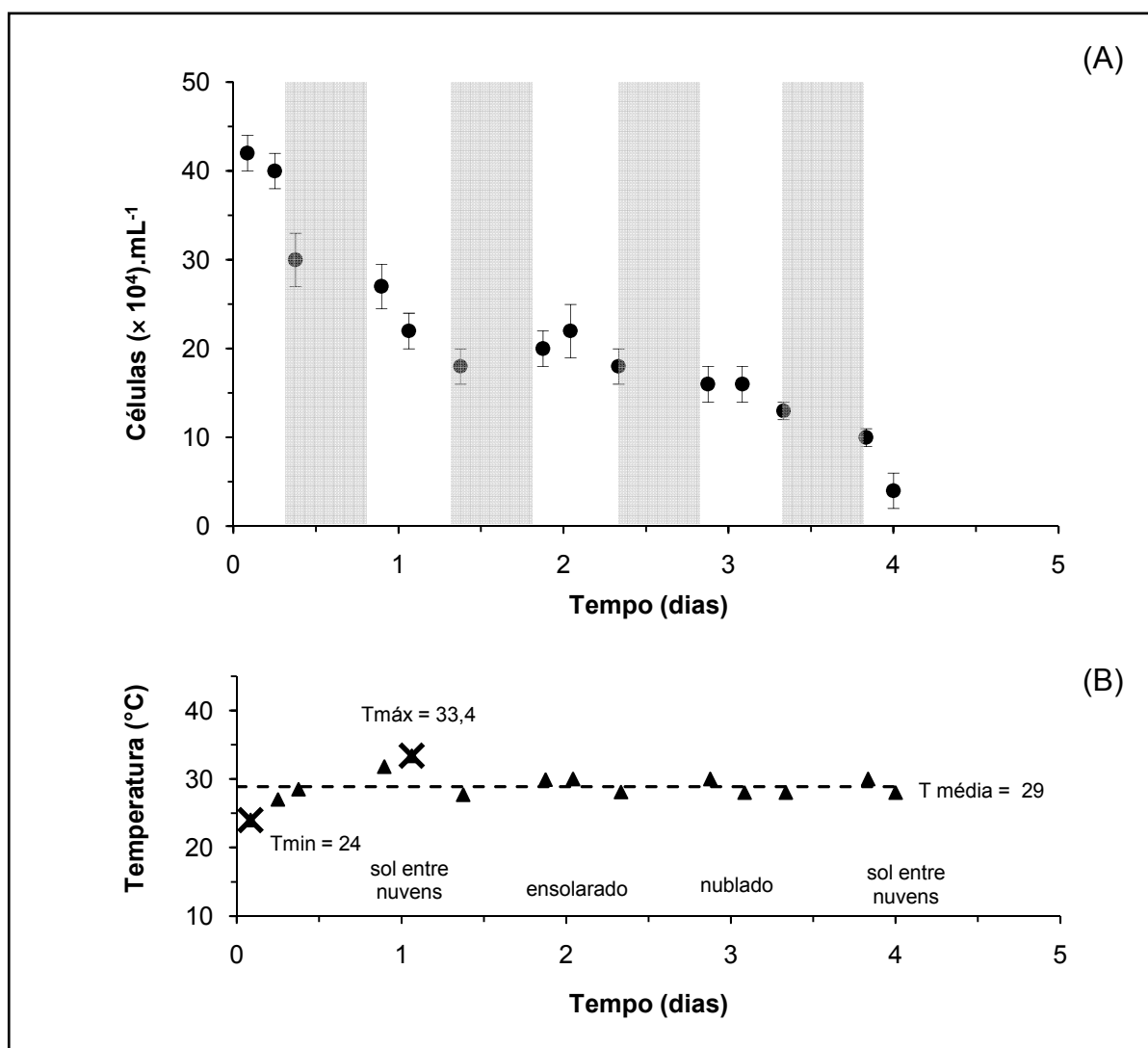


FIGURA 16 - CULTIVO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM MINIFOTOBIOREATOR COM BOMBA CENTRÍFUGA B1 (SCHNEIDER). (A) DENSIDADE CELULAR, (B) CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8). As barras cinza (A) representam o período noturno (escuro) do fotoperíodo. Os pontos assinalados (x) na Figura B representam as temperaturas mínima e máxima observadas.

Considerando os fatos observados, concluiu-se que a redução da densidade celular pode ter sido causada principalmente pelos seguintes motivos:

- temperatura alta (33,4°C) causada principalmente pelo superaquecimento da bomba. Não foram encontrados na literatura cultivos com *Phaeodactylum tricornutum* com temperaturas acima de 27 °C;
- contaminação do meio de cultura por componentes da bomba, visto que foi observada coloração anormal do meio de cultura;

- estresse hidrodinâmico provocado pela bomba centrífuga durante a passagem do meio de cultura pelo rotor. O tipo de bomba envolvida e a geometria do sistema, que determina a frequência da passagem das células em suspensão pela bomba, podem causar dano celular (GUDIN; CHAUMONT, 1991).

Uma vez que a contaminação do meio de cultura provocada pelo material da bomba B1 pode ter causado a diminuição da densidade celular, foi realizada a substituição pela bomba centrífuga B2 (Dancor), com carcaça de alumínio e rotor de plástico (PVC). Após instalação da bomba B2, foi feita novamente a limpeza do sistema, conforme descrito na seção 4.4. Desta vez, não foi observada mudança de coloração da água circulada durante a limpeza.

O minifotobiorreator foi novamente abastecido com meio de cultivo e inóculo. Em seguida foi iniciado o monitoramento (conforme descrito na seção 4.4) do pH, densidade celular (Figura 17A), temperatura da cultura e variações climáticas (Figura 17B). O pH inicial do meio de cultura foi de $7,6 \pm 0,1$ e manteve-se na faixa de $7,6 \pm 0,1$ a $7,8 \pm 0,1$ ao longo do cultivo. De novo o fotoperíodo foi de 12,2h de luz.

A densidade celular (Figura 17A) (inicialmente $(96 \pm 3) \times 10^4$ células.mL⁻¹) foi diminuindo diariamente, e o experimento foi encerrado no quarto dia, com densidade celular final de $(4 \pm 2) \times 10^4$ células.mL⁻¹. Neste experimento foi utilizada uma densidade celular inicial 2,3 vezes maior do que no primeiro experimento, na tentativa de minimizar o efeito de fotoinibição. A coloração (Figura 18) do meio de cultura foi clareando sutilmente ao longo do cultivo, no entanto, não foi observada coloração anormal, como ocorrido no primeiro experimento.

A temperatura (mínima) inicial do meio de cultura foi de 24,2 °C, e a temperatura máxima (anotada) foi de 27,5 °C. Notou-se que a nova bomba (B2) também provocou aquecimento do meio de cultura, sendo assim, optou-se por circular água da torneira pela serpentina continuamente. Devido ao fato que a transferência de calor durante a passagem do meio de cultura pela bomba B2 foi menor em relação à transferência de calor da bomba B1, foi possível manter a temperatura do sistema, na maior parte do tempo, na média de 26 °C (Figura 17B).

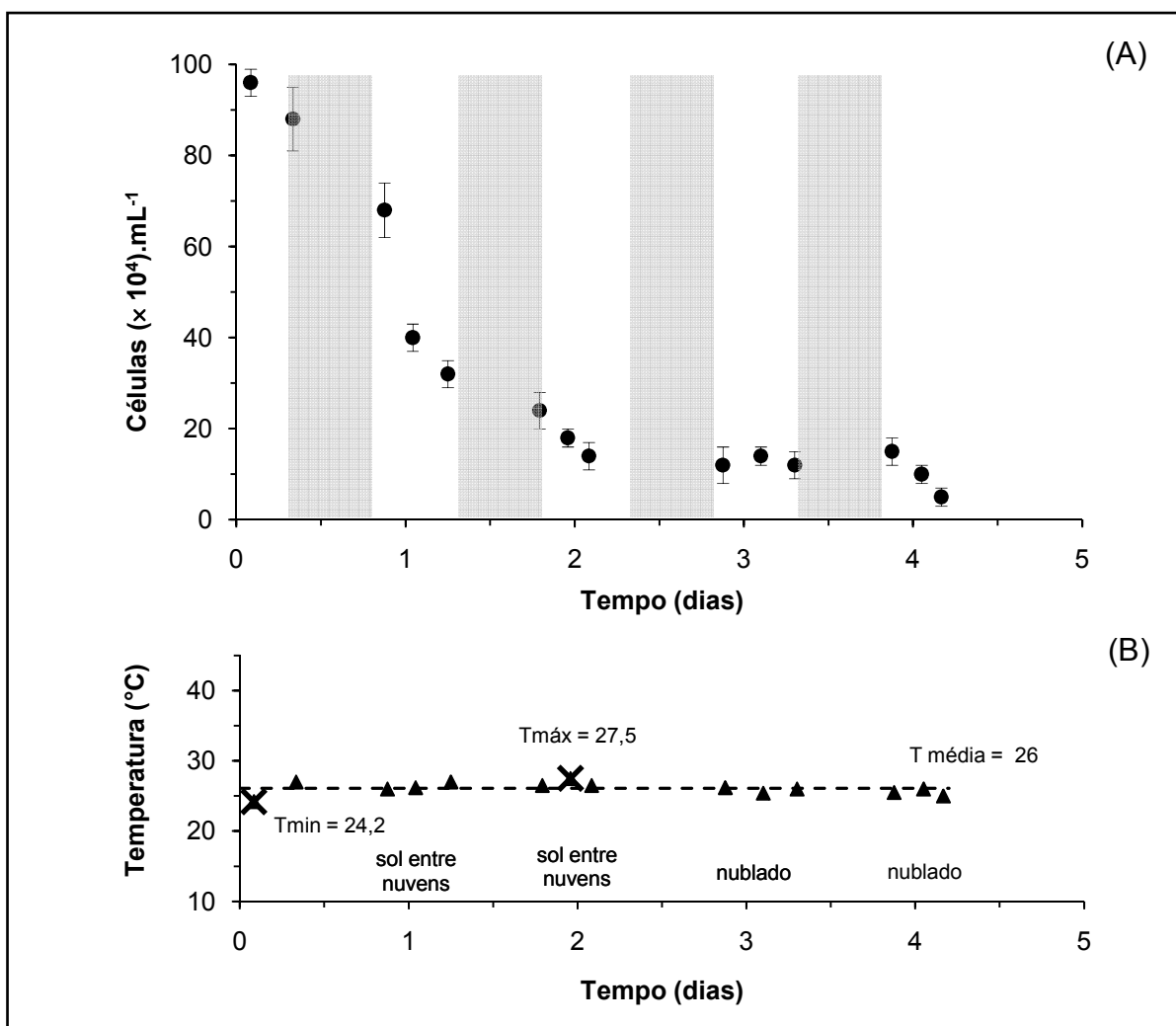


FIGURA 17 - CULTIVO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM MINIFOTOBIOREATOR COM BOMBA CENTRÍFUGA B2 (DANCOR). (A) DENSIDADE CELULAR; (B) CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

As barras verticais representam o erro padrão (n = 3) (seção 4.8). As barras cinza (A) representam o período noturno (escuro) do fotoperíodo. Os pontos assinalados (x) na Figura B representam as temperaturas mínima e máxima observadas.

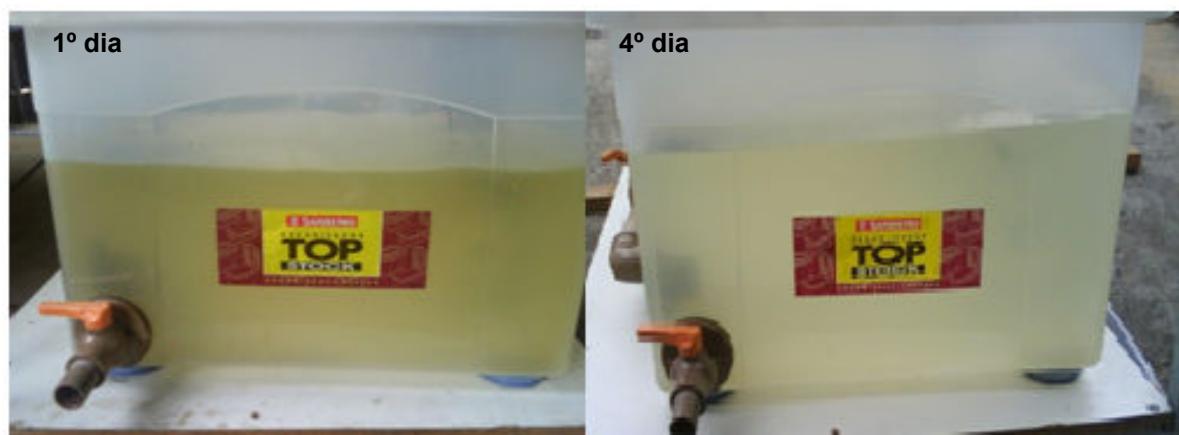


FIGURA 18 - ASPECTO DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA EM MINIFOTOBIOREATOR COM BOMBA CENTRÍFUGA B2

Este experimento mostrou que, mesmo após a troca da bomba, não ocorreu aumento da densidade celular. Além disso, em comparação com o experimento anterior, a maior densidade celular inicial ($(96 \pm 3) \times 10^4$ células.mL⁻¹) e as menores temperaturas ($T_{\text{máxima}} = 27,5$ °C e $T_{\text{média}} = 26$ °C) observadas também não influenciaram a densidade celular final.

Para descartar a hipótese de contaminação do meio de cultura, 1 h após enchimento do minifotobiorreator e circulação do meio de cultura com a bomba B2, foi coletado 1,6 L de meio de cultura, que foi chamado de controle. O controle foi cultivado em sala climatizada em condições constantes de temperatura (20 ± 2 °C), fotoperíodo (24 h de luz), iluminação (lâmpadas luz do dia – 40 W) e agitação (aeração com compressor de ar atmosférico). Observou-se que a densidade celular (Figura 19) aumentou exponencialmente até o terceiro dia e atingiu estado estacionário no sétimo dia. A densidade celular máxima foi de 1541×10^4 células.mL⁻¹ de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos no experimento descrito na seção 5.1.1 (Figura 13B). Estes resultados indicam que a cultura estava saudável e não houve indícios de contaminação.

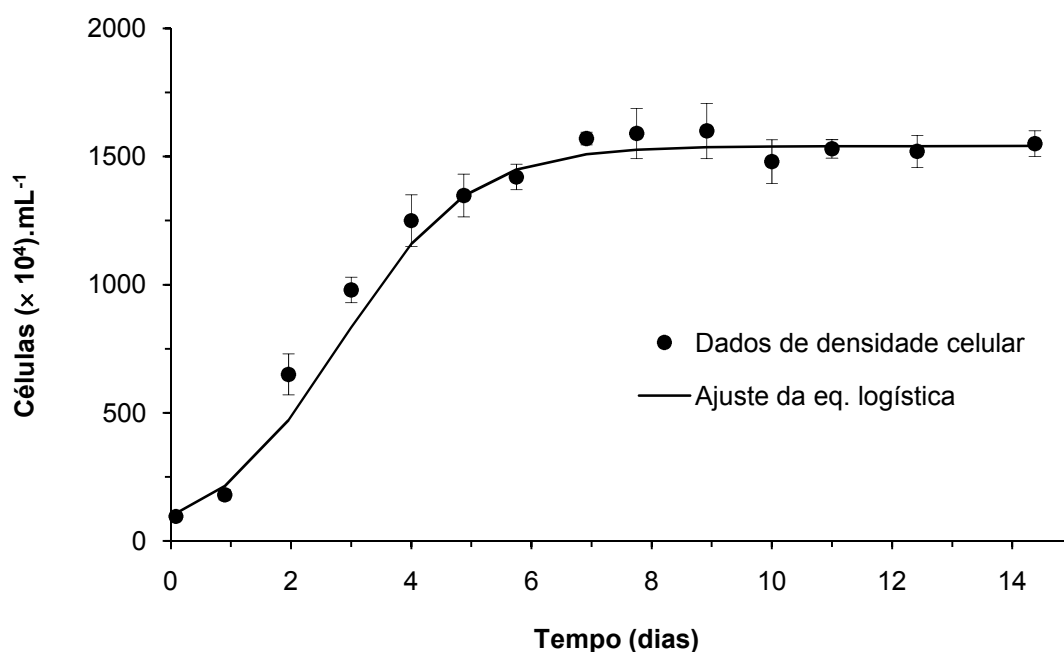


FIGURA 19 – CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA (CONTROLE) *Phaeodactylum tricornutum* EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO.

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8).

A partir da avaliação dos resultados obtidos nesta segunda tentativa, concluiu-se que provavelmente a tensão de cisalhamento provocada pela bomba centrífuga (B1 e B2) durante a passagem do meio de cultura pelo rotor foi o principal motivo da redução da densidade celular.

Para confirmar esta hipótese, foram feitos dois experimentos em paralelo: um teste com a bomba B2 para avaliar somente o efeito do bombeamento e um teste com uma eletrobomba (B3) com rotor semi-aberto (provoca menos cisalhamento) de pás e carcaça de plástico.

O teste com a bomba B2 foi preparado de acordo com protocolo descrito na seção 4.4.1. A bomba B2 foi retirada do minifotobiorreator e testada isoladamente através de recirculação de um meio de cultura em um tanque. Foram preparados dois cultivos de 100 L cada em tanques de fibra: um controle (sem bombeamento) e outro submetido a bombeamento de cinco horas por dia (em recirculação) a partir do segundo dia de cultivo, durante seis dias consecutivos. A densidade celular (Figura 20) da amostra controle (sem ação de bombeamento) foi determinada uma vez ao dia e a densidade celular da amostra bombeada foi determinada duas vezes ao dia (antes e após bombeamento) nos dias que ocorreu bombeamento (2º ao 7º dia) e uma vez ao dia nos dias que não ocorreu bombeamento. No entanto, a diferença entre a densidade celular determinada antes e logo após bombeamento não foi significativa, sendo assim, foi considerado apenas um ponto por dia (pontos O, Figura 20) correspondente às duas leituras de densidade celular.

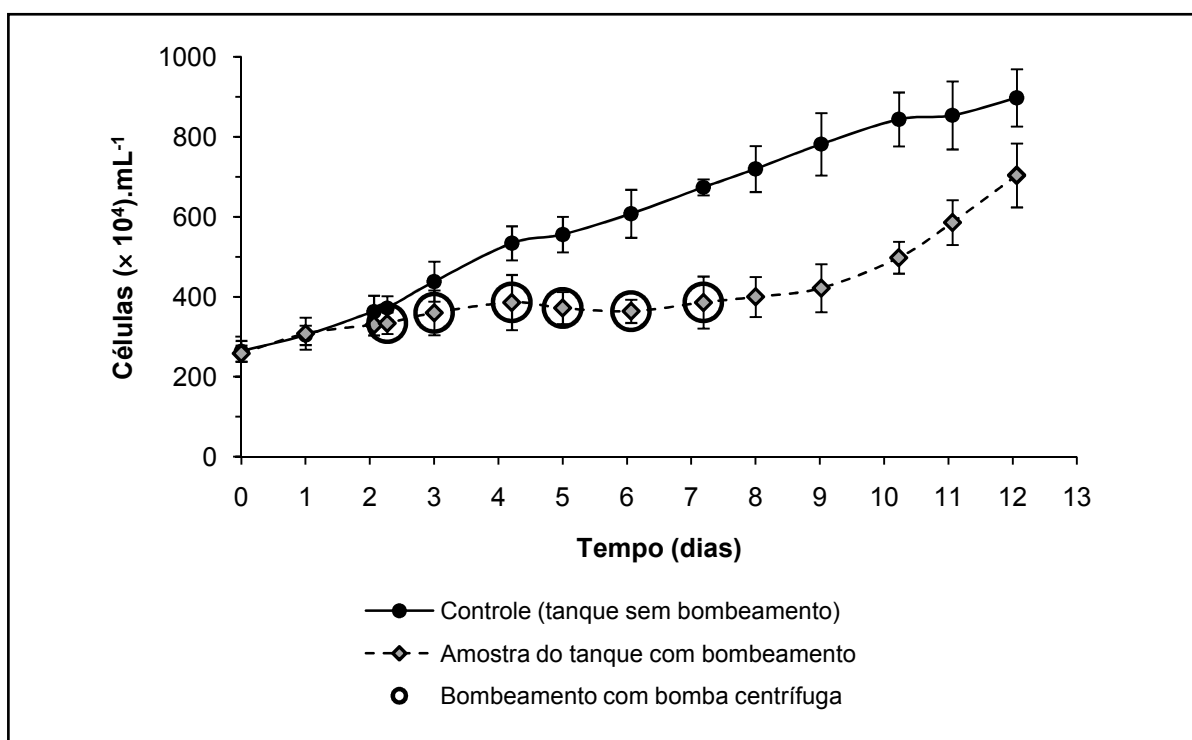


FIGURA 20 - EFEITO DO BOMBEAMENTO DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* NA PRODUÇÃO DE CÉLULAS EM TANQUES. As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8).

A densidade celular (Figura 20) da amostra controle inicialmente foi de $(264 \pm 24) \times 10^4$ células.mL⁻¹ e aumentou diariamente até o último dia de cultivo (12º dia), atingindo densidade de $(898 \pm 72) \times 10^4$ células.mL⁻¹. O meio de cultura da amostra bombeada foi preparado inicialmente com a mesma densidade celular da amostra controle. Ao segundo dia a densidade celular determinada antes do bombeamento foi de $(330 \pm 26) \times 10^4$ células.mL⁻¹ e permaneceu constante até um dia depois do bombeamento (oitavo dia). Após dois dias sem bombeamento, a densidade celular da cultura aumentou ($400 \pm 38 \times 10^4$ células.mL⁻¹) significativamente em relação ao segundo dia e continuou aumentando diariamente até o último dia de cultivo (12º dia), atingindo densidade de $(704 \pm 70) \times 10^4$ células.mL⁻¹. Nota-se que durante o bombeamento, o número de células permaneceu constante. Provavelmente ocorreram lise e multiplicação celular na mesma razão simultaneamente. O aumento celular, observado após dois dias sem bombeamento, foi ocasionado pela maior multiplicação do que lise celular.

O efeito do bombeamento do meio de cultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* foi relatado apenas por Aliás *et al.* (2004), onde a cultura, após atingir a

fase estacionária do ciclo de crescimento, foi mantida em circulação com bomba centrífuga em um fotobiorreator tubular de escala piloto. O bombeamento causou morte celular, no entanto, não foram relatados detalhes do volume e vazão do meio de cultura bombeado.

Conforme relatado na revisão bibliográfica (seção 2.3.2), o maior fotobiorreator (Figura 3a) em operação no mundo, da empresa ÖPA, utiliza bombas centrífugas para movimentar o meio de cultura da microalga *Chlorella*, no entanto, não foram encontrados informações a respeito da bomba.

Diante dos resultados obtidos nos experimentos feitos com o minifotobiorreator e com as informações a respeito de bombas centrífugas, encontrados na literatura, suspeitou-se que a lise celular pode ter sido causada pela frequência da passagem das células em suspensão pela bomba. O número de passagens pela bomba é inversamente proporcional ao volume de operação do sistema. Portanto, a uma vazão constante, quanto maior o volume de operação de um sistema, menor será o número de passagens pela bomba. Considerando-se esta hipótese, e que os resultados deste trabalho contribuirão com o projeto do NPDEAS, foram estimados o número de passagens do meio de cultura através da bomba centrífuga no minifotobiorreator e o número de passagens no fotobiorreator que será operado no NPDEAS. O número de passagens foi estimado através da seguinte equação:

$$N_p = Q/V_{op}. \quad \text{Eq. 10}$$

onde:

N_p = número de passagens (h^{-1});

$Q = 1800 \text{ (L.h}^{-1}\text{)}$, considerando a vazão volumétrica da bomba centrífuga (Dancor, 0,25 CV) com rotor de PVC;

$V_{op.}$ = volume de operação do sistema (L).

O volume de operação considerado para os cálculos do número de passagens foi de 70 L para o minifotobiorreator e de 10000 L (referente ao volume de um módulo) para o fotobiorreator do NPDEAS. Sendo assim, o número de passagens calculado foi de 25,7 (h^{-1}) para o minifotobiorreator e de 0,18 (h^{-1}) para um módulo do fotobiorreator do NPDEAS. Isto significa que, o número de passagens estimado para o fotobiorreator do NPDEAS foi 143 vezes menor em relação ao minifotobiorreator. Com isto, espera-se que o cisalhamento produzido pela

passagem das células em suspensão pela bomba seja suficientemente menor, de forma a não prejudicar o desenvolvimento da cultura. Portanto, a idéia do uso de bomba centrífuga ainda não pode ser desconsiderada para circulação de volumes grandes, uma vez que o número de passagens seria relativamente menor.

O outro experimento, feito em paralelo ao da bomba B2, foi feito no minifotobiorreator. A bomba B2 foi substituída por uma eletrobomba (B3) com rotor semi-aberto de pás e carcaça de plástico. Não foi encontrado na literatura um sistema para cultivo de microalgas com este tipo de bomba (B3), no entanto a equipe (NPDEAS) responsável pela construção do minifotobiorreator concluiu que este tipo de bomba se adaptaria ao minifotobiorreator sem precisar de grandes modificações e pelo seu baixo custo. Após substituição da bomba, foi realizada novamente a limpeza do sistema, conforme descrito na seção 4.4.

O minifotobiorreator foi abastecido com meio de cultivo e inóculo. Então foi iniciado o monitoramento (conforme descrito na seção 4.4) da densidade celular (Figura 21A), da temperatura da cultura e variações climáticas (Figura 21B) e do pH (Figura 21C). O fotoperíodo referente ao mês do experimento (maio) foi de 11 h de luz.

Diferentemente das tentativas anteriores, a densidade celular (Figura 21A) (inicialmente $(90 \pm 8) \times 10^4$ células.mL⁻¹) aumentou 24 h após o início do cultivo, e a maior densidade celular (250×10^4 células.mL⁻¹) foi observada no quinto dia. A partir do sexto dia de cultivo, o motor da bomba começou a falhar e não foi observado diferenças significativas na densidade celular (Figura 21A) até o último dia de cultivo. Ao sétimo dia (Figura 22), o motor da bomba não suportou funcionamento contínuo e queimou. Diante deste fato o experimento teve que ser encerrado. Não foi possível constatar se a cultura já tinha alcançado a fase estacionária do ciclo de crescimento, pois a bomba parou de funcionar.

A temperatura (Figura 21B) inicial do meio de cultura foi de 22,5 °C, e as temperaturas, mínima e máxima, anotadas foram de 14,5 °C e de 27 °C, respectivamente. A média de temperatura (20 °C) anotada neste experimento foi 6 °C menor do que a média de temperatura da segunda tentativa de cultivo no minifotobiorreator. Notou-se que a nova bomba não provocou aquecimento do meio de cultura, sendo assim, optou-se por circular água da torneira pela serpentina apenas quando a temperatura alcançou 26 °C. Além disso, o clima durante este experimento estava mais frio do que nos experimentos anteriores.

O pH foi monitorado e os valores medidos foram confrontados com a progressão do crescimento celular (Figuras 21A e 21C). A partir destes dados observa-se que ocorre o aumento do pH (de $7,7 \pm 0,1$ a $9,5 \pm 0,1$) com o aumento da densidade celular.

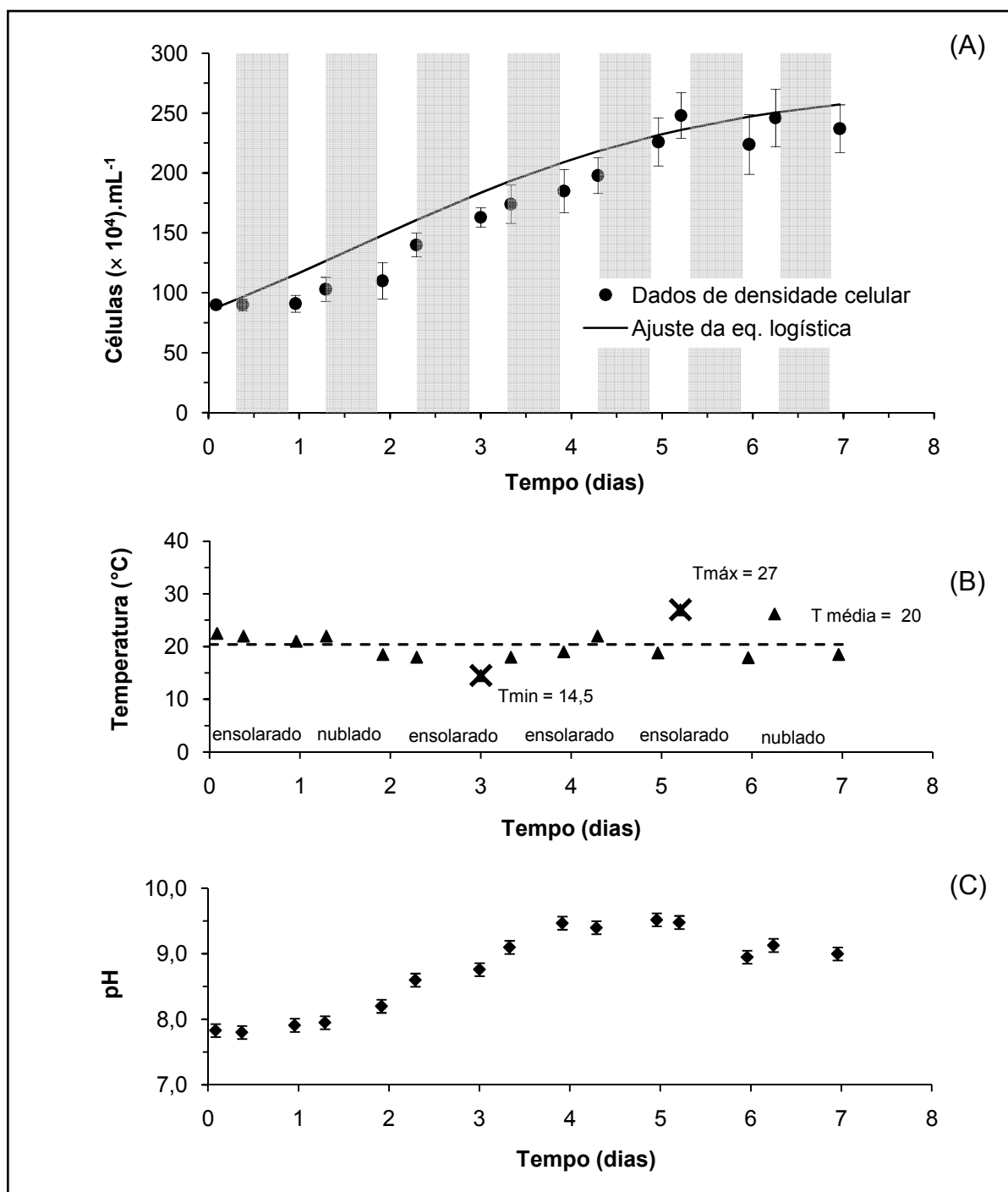


FIGURA 21 - CULTIVO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM MINIFOTOBIOREATOR COM ELETROBOMBA B3. (A) DENSIDADE CELULAR; (B) CONDIÇÕES CLIMÁTICAS; (C) pH

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8) (A) e a incerteza do pHmetro (C). As barras cinza (A) representam o período noturno (escuro) do fotoperíodo. Os pontos assinalados (x) na Figura B representam as temperaturas mínima e máxima observadas.



FIGURA 22 - ASPECTO DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* APÓS SETE DIAS DE CULTIVO

A partir dos resultados obtidos e das observações realizadas foram propostas algumas modificações, de acordo com a Tabela 9.

TABELA 9 - MODIFICAÇÕES SUGERIDAS PARA EXPERIMENTOS FUTUROS NO MINIFOTOBIOREATOR APÓS DISCUSSÃO DE RESULTADOS

OBSERVAÇÕES REALIZADAS	MODIFICAÇÕES SUGERIDAS
(1) Bombeamento do meio de cultura: a bomba B3 aparentemente foi a bomba mais apropriada para o minifotobiorreator, pois quando foi utilizada esta bomba, ocorreu aumento da densidade celular e não foi observado aumento da temperatura do meio de cultura durante a passagem pela bomba. No entanto, o motor não resistiu ao funcionamento contínuo a partir do sexto dia.	Substituição da bomba queimada por outra bomba com material similar (carcaça e rotor de pás de plástico) ao da bomba B3, mas com motor resistente a funcionamento contínuo.
(2) Variação do pH: observou-se que o pH aumentou, devido à diminuição da disponibilidade de CO ₂ , causada pelo aumento da densidade celular. A limitação de CO ₂ pode inibir o crescimento celular.	Instalação de um sistema de injeção de CO ₂ .
(3) Monitoramento do sistema: o sistema foi monitorado na maior parte do tempo das 8 às 18 h, portanto as temperaturas e pH anotados são estimativas.	Instalação de um pHmetro e termômetro com saída para placa de aquisição de dados automática.
(4) Variações climáticas: a variação climática (temperatura, luminosidade, fotoperíodo) dificulta a reprodutibilidade e comparação dos experimentos.	Adaptação de um local com condições (temperatura, fotoperíodo, iluminação) controladas para instalação do minifotobiorreator.

Diante da necessidade de modificações no minifotobiorreator e do tempo necessário para viabilizar seu funcionamento. Optou-se por estudar o cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em erlenmeyers de 2 L em sala climatizada em diferentes condições e regimes de cultivo.

5.4 CULTIVO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM REGIME DE BATELADA

5.4.1 Cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em diferentes densidades celulares iniciais de inóculo

Não foram encontrados na literatura estudos que mostrassem a influência da densidade celular inicial em cultivos de microalgas. A única informação fornecida é que a propagação dos cultivos é feita geralmente na fase de crescimento exponencial e na relação de 1:10 (inóculo:meio de cultivo). Diante disto, foi realizado um experimento para avaliar a influência da densidade celular inicial na produção de biomassa e lipídeos. Para isto, foram preparados cinco grupos de cultivos (de acordo com procedimento descrito em 4.3.2.2) com diferentes densidades celulares iniciais da microalga *P. tricornutum*:

- N1: 5×10^4 células.mL⁻¹, preparado a partir de 0,6% de inóculo;
- N2: 10×10^4 células.mL⁻¹, preparado a partir de 1,2% de inóculo;
- N3: 30×10^4 células.mL⁻¹, preparado a partir de 3,5% de inóculo;
- N4: 50×10^4 células.mL⁻¹, preparado a partir de 5,9% de inóculo;
- N5: 100×10^4 células.mL⁻¹, preparado a partir de 11,7% de inóculo.

As diferenças entre as densidades celulares foram observadas visivelmente (Figura 23) no terceiro dia de cultivo. A variação da densidade celular inicial do meio de cultura influenciou na curva de crescimento (Figura 24). Para cada concentração de inóculo foi determinada a densidade celular máxima alcançada (Figura 25) através do ajuste da equação logística aos dados. A maior densidade celular máxima (1680×10^4 células.mL⁻¹) foi obtida pelo grupo que foi preparado com densidade celular inicial de 30×10^4 células.mL⁻¹. A densidade celular máxima diminuiu significativamente quando a concentração de inóculo foi diminuída e relativamente pouco quando a concentração de inóculo foi aumentada (Figura 25).

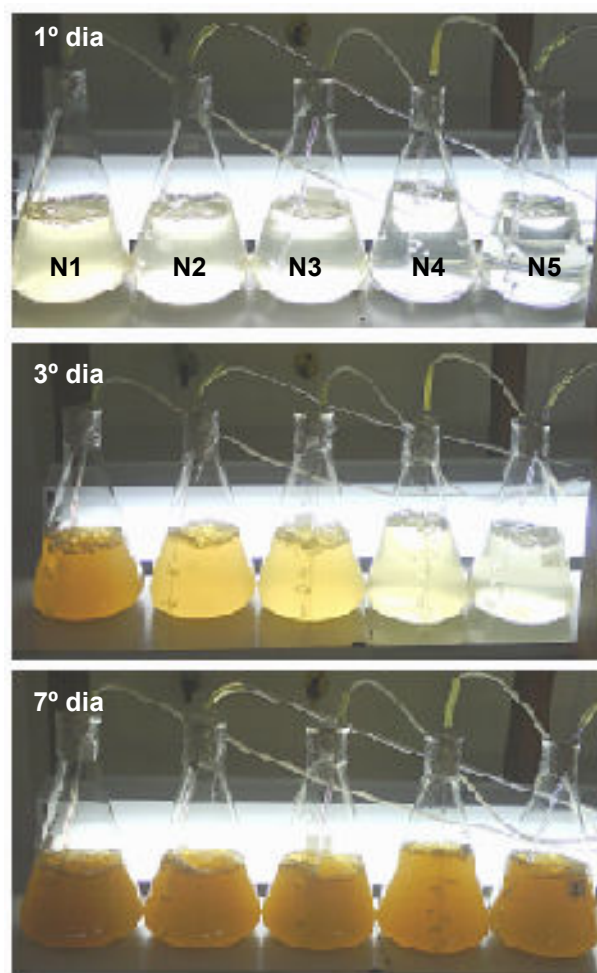


FIGURA 23 - ASPECTOS DO MEIO DE CULTURA DA MICROALGA *P. tricornutum* A PARTIR DE DIFERENTES DENSIDADES CELULARES INICIAIS

N representa a densidade celular (células.mL⁻¹) inicial aplicada, sendo: N1 = 5×10^4 ; N2 = 10×10^4 ; N3 = 30×10^4 ; N4 = 50×10^4 ; N5 = 100×10^4 .

Os grupos com densidades celulares iniciais mais baixas (5×10^4 células.mL⁻¹ e 10×10^4 células.mL⁻¹) tiveram a fase de adaptação do ciclo de crescimento mais longa em relação aos outros grupos. Isto pode ter sido causado pelo aumento da exposição das células a luz, pois, ao diluir a cultura, as células ficam mais expostas à luz, e um excesso de luz pode provocar fotoinibição (RUBIO *et al.*, 2003).

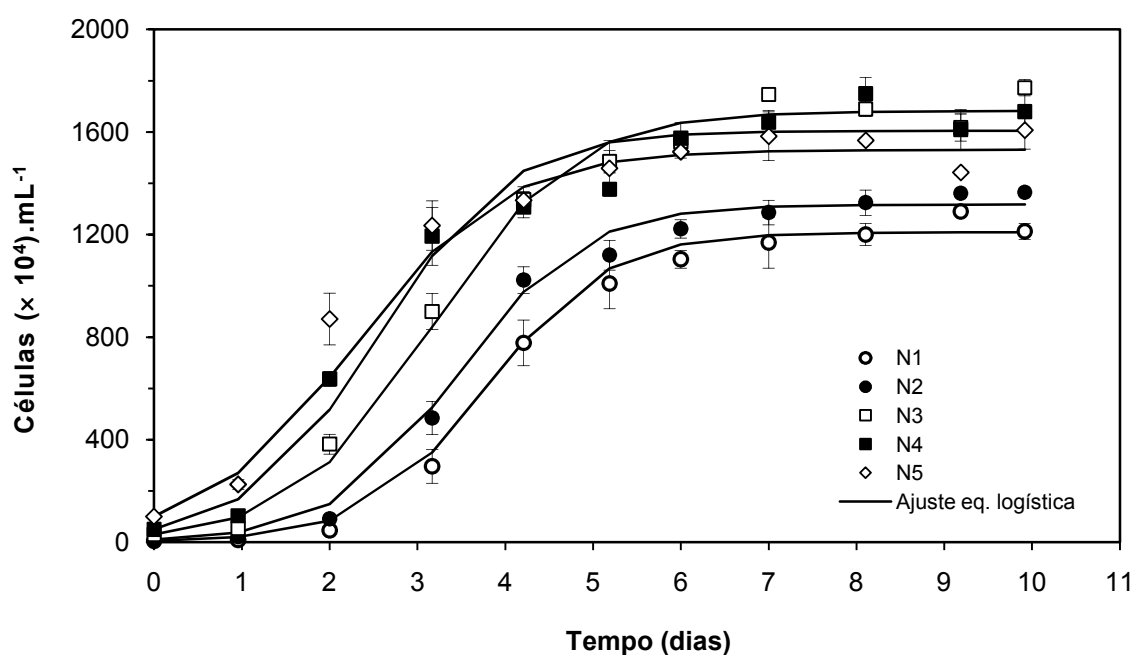


FIGURA 24 - PRODUÇÃO DE CÉLULAS DA MICROALGA *P. tricornutum* A PARTIR DE DIFERENTES DENSIDADES CELULARES INICIAIS

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8). N representa a densidade celular (células. mL^{-1}) inicial utilizada, sendo: N1 = 5×10^4 ; N2 = 10×10^4 ; N3 = 30×10^4 ; N4 = 50×10^4 ; N5 = 100×10^4 .

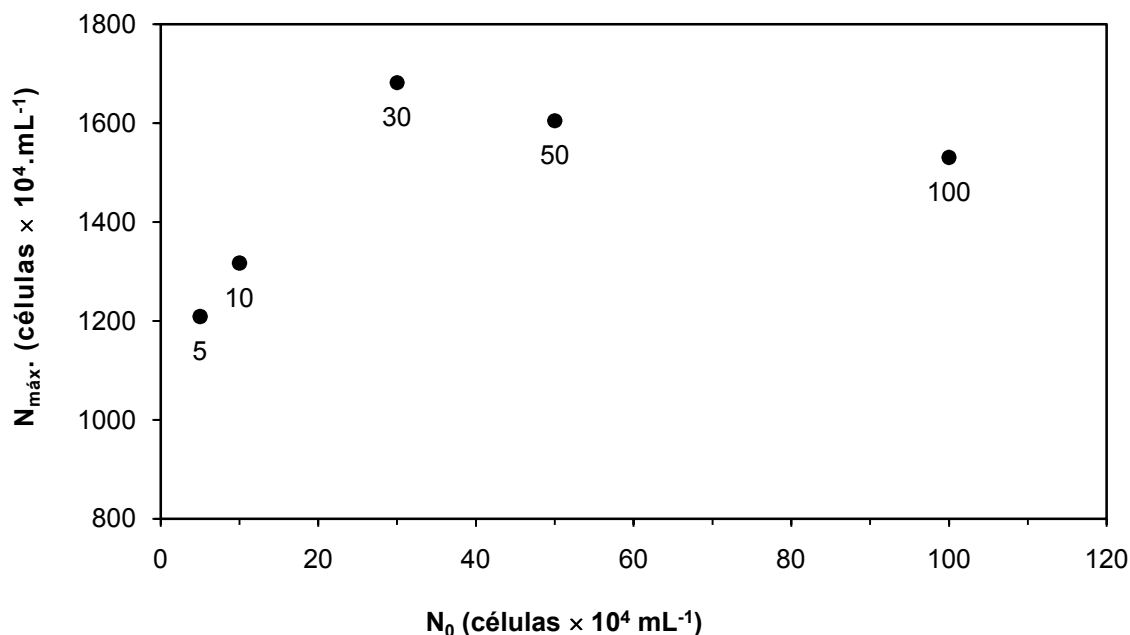


FIGURA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DENSIDADES CELULARES MÁXIMAS OBTIDAS EM DIFERENTES DENSIDADES CELULARES INICIAIS

A produção de biomassa seca e lipídeos dos cinco grupos foi avaliada no sétimo dia do cultivo (Tabela 10). Os maiores rendimentos, tanto em biomassa quanto em lipídeos, foram obtidos pelos grupos que foram preparados com densidades celulares inicial de 30×10^4 células. mL^{-1} e 50×10^4 células. mL^{-1} . O menor

valor de produtividade de biomassa foi aproximadamente 82% do maior valor, e o menor valor de produtividade de lipídeo foi aproximadamente 68% do maior valor.

TABELA 10 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE INÓCULO

N ₀ (células.mL ⁻¹)	5×10 ⁴	10×10 ⁴	30×10 ⁴	50×10 ⁴	100×10 ⁴
Amostragem (dias de cultivo)	7	7	7	7	7
Biomassa (g.L ⁻¹)	0,53 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,64 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,58 ± 0,01
Lipídeos (% de biomassa seca)	12,4 ± 0,1	16,1 ± 0,02	17,8 ± 0,9	18,1 ± 0,5	16,6 ± 0,4
Lipídeos (mg.L ⁻¹ de meio de cultura)	65,5 ± 0,7	90,6 ± 0,1	113,6 ± 5,8	109,0 ± 3,0	96,2 ± 2,1

Os resultados mostrados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão (seção 4.8).

Este experimento mostrou que a densidade celular inicial do meio de cultura influenciou na produção de células, no rendimento de biomassa e no teor lipídico, portanto é um fator que deve ser considerado ao estudar o crescimento de microalgas. Visto que foi obtida uma maior produção de biomassa e lipídeos nos cultivos preparados com densidade celular inicial de 30×10⁴ células.mL⁻¹ e 50×10⁴ células.mL⁻¹, optou-se por preparar os experimentos futuros com densidades celulares iniciais dentro desta faixa.

5.4.2 Cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em diferentes fotoperíodos

A produção de microalgas em escala comercial é feita em ambientes expostos a variações climáticas de temperatura, fotoperíodo e luz.

Neste experimento, foram comparados cultivos com fotoperíodo de 12 h de luz e 24 h de luz. Os erlenmeyers foram preparados conforme procedimento descrito na seção 4.3.2.3. Foram avaliados o crescimento celular (Figuras 26) e as concentrações de biomassa e lipídeos (Tabela 11) de cada cultivo. A densidade celular da cultura mantida em fotoperíodo de 12 h de luz foi determinada no início do ciclo de luz (9 h) e no final do ciclo de luz (21 h).

A densidade celular máxima alcançada, no sétimo dia de cultivo, pela cultura mantida em fotoperíodo de 24 h foi 1,2 vezes maior do que a densidade celular máxima da cultura mantida em fotoperíodo de 12 h, alcançada no décimo dia de

cultivo. A velocidade específica máxima de crescimento foi 1,5 vezes maior para as culturas mantidas em fotoperíodo de 24 h de luz (Tabela 11).

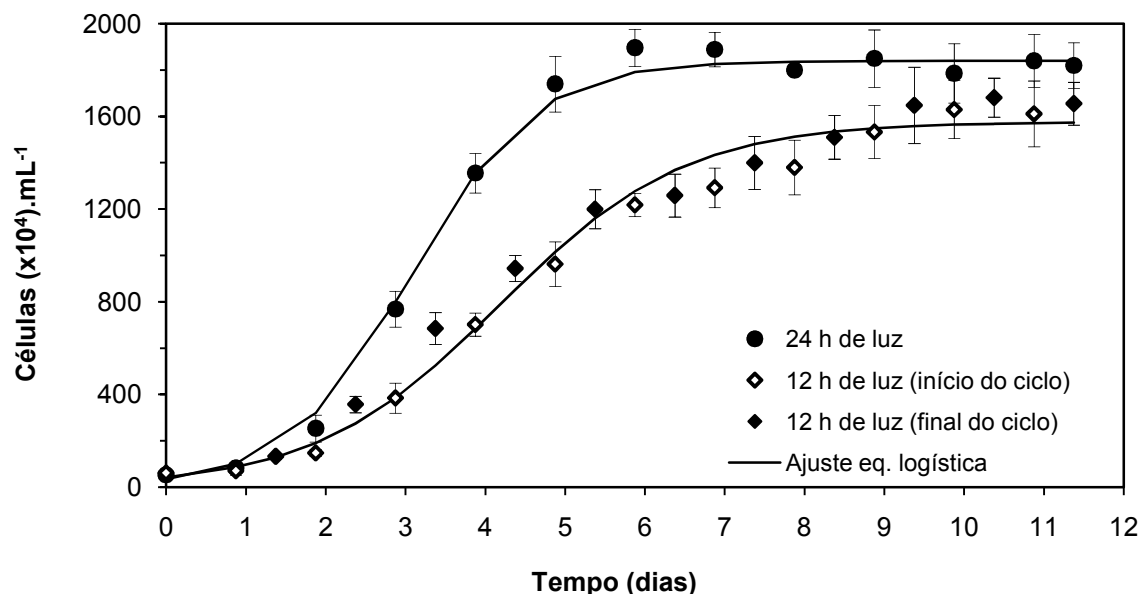


FIGURA 26 - PRODUÇÃO DE CÉLULAS DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM DIFERENTES FOTOPERÍODOS

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8).

TABELA 11 - ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA COM DIFERENTES FOTOPERÍODOS

Fotoperíodo (horas de luz)	24 h	12 h
N_0 ($\times 10^4$ células.mL $^{-1}$)	42	42
$N_{\text{máx}}$ ($\times 10^4$ células.mL $^{-1}$)	1840	1576
$\mu_{\text{máx}}$ (dia $^{-1}$)	1,28	0,86
$DC_{\text{máx}}$	7	10
Intervalo do ajuste da eq. logística (dia)	0 - 11	0 - 11

N_0 : densidade celular inicial; $N_{\text{máx}}$: densidade celular máxima; μ : velocidade específica de crescimento; $DC_{\text{máx}}$: dia do cultivo em que foi alcançada densidade celular máxima.

As concentrações de biomassa e lipídeos foram determinadas no décimo dia de cultivo, quando as culturas já estavam na fase estacionária do ciclo de crescimento. A produção de biomassa das culturas cultivadas em fotoperíodo de 24 h de luz foi 1,2 vezes maior do que a produção de biomassa das culturas cultivadas em fotoperíodo de 12 h, e a produção de lipídeos foi 2,4 vezes maior (Tabela 12).

TABELA 12 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA COM DIFERENTES FOTOPERÍODOS

Fotoperíodo (horas de luz)	24 h	12 h
Amostragem (dias de cultivo)	10	10
Biomassa (g.L ⁻¹)	1,21 ± 0,04	1,01 ± 0,03
Lipídeos (% de biomassa seca)	17,8 ± 1,1	8,8 ± 0,7
Lipídeos (mg.L ⁻¹ de meio de cultura)	215	89

Os resultados mostrados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão (seção 4.8).

5.5 CULTIVO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM REGIME SEMICONTÍNUO

O cultivo semicontínuo tem potencial de obter maior produtividade volumétrica de biomassa do que o cultivo em batelada, pois a colheita pode ser feita periodicamente por um longo período de tempo (COUTTEAU, 1996). Além disso, as etapas de limpeza, abastecimento e esterilização do reator são feitas em intervalos de tempo maiores do que o regime em batelada.

Neste experimento foram preparados quatro grupos de cultivos (conforme descrito na seção 4.3.3) que foram submetidos a diferentes regimes de cultivo:

- batelada;
- semicontínuo com substituição de 10% do volume da cultura a cada 7 h;
- semicontínuo com substituição de 20% do volume da cultura a cada 14 h;
- semicontínuo com substituição de 30% do volume da cultura a cada 21 h.

Os intervalos entre as substituições foram calculados a partir da velocidade específica de crescimento (μ) do terceiro ao quarto dia de cultivo obtido dos dados da densidade celular da cultura em regime de batelada. A velocidade de crescimento foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\mu = \ln (N/N_0) / \Delta t \quad \text{Eq. 11}$$

onde foram considerados:

$N = 1350 \times 10^4$ células.mL⁻¹ (densidade celular no quarto dia);

$N_0 = 954 \times 10^4$ células.mL⁻¹ (densidade celular no terceiro dia);

$\Delta t = 24$ h (intervalo de tempo entre N e N_0).

A velocidade de crescimento calculada a partir dos dados foi de $0,0143 \text{ h}^{-1}$. Foi considerado estado pseudoestacionário, onde a velocidade específica de crescimento é igual à taxa de diluição média do regime semicontínuo (D_{sc}):

$$D_{sc} = F_{sc}/V_t = \mu \quad \text{Eq. 12}$$

$$F_{sc} = V_d / t_d \quad \text{Eq. 13}$$

onde:

F_{sc} = volume recolhido em cada diluição dividido pelo intervalo entre as diluições (mL.h^{-1});

V_t = volume total do cultivo;

V_d = volume de cultura substituído por meio de cultivo novo em cada diluição;

t_d = intervalo de tempo (h) entre as substituições.

Rearranjando as equações 12 e 13, foram calculados os intervalos de tempo para cada substituição:

$$t_d = V_d / (\mu \times V_t)$$

Se definirmos a percentagem de substituição como:

$$D_{sc} (\%) = V_d \times 100\% / V_t$$

Podemos escrever:

$$T_d = S_{sc} (\%) / (100 \% \times \mu) \quad \text{Eq. 14}$$

Então, considerando $\mu = 0,0143 \text{ h}^{-1}$, os intervalos de tempo para cada diluição utilizada foram:

- 7 h para substituição de 10%;
- 14 h para substituição de 20%;
- 21 h para substituição de 30%.

As diluições foram iniciadas após quatro dias de cultivo, quando as culturas estavam na fase final de crescimento exponencial, e foram mantidas em regime semicontínuo por cinco dias (Figura 27). A densidade celular média das culturas antes das diluições foi de $(1350 \pm 108) \times 10^4 \text{ células.mL}^{-1}$, e durante o regime semicontínuo de 10, 20 e 30% foram de $(1426 \pm 137) \times 10^4$, $(1276 \pm 166) \times 10^4$ e $(1185 \pm 117) \times 10^4 \text{ células.mL}^{-1}$, respectivamente. Isto significa que o intervalo de tempo utilizado entre as diluições não influenciou significativamente ($p > 0,05$; teste t) na densidade celular média das amostras.

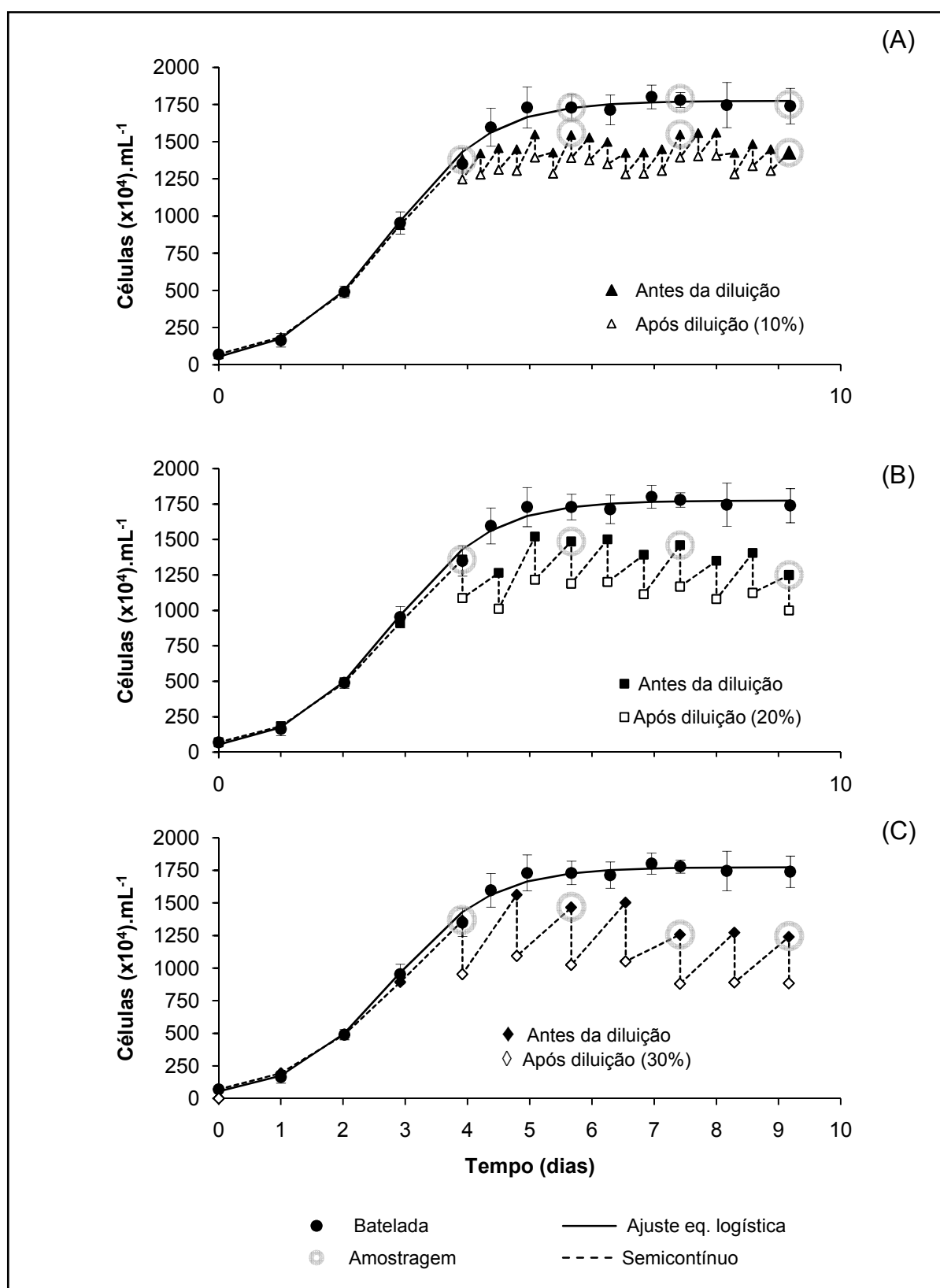


FIGURA 27 - PRODUÇÃO DE CÉLULAS DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM REGIME DE BATELADA E SEMICONTÍNUO UTILIZANDO DILUIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE 10% (A), 20% (B) E 30% (C)

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8). Os círculos (○) indicam os pontos de amostragem para as determinações de biomassa e lipídeos

As concentrações de biomassa e lipídeos das culturas foram determinadas em quatro dias diferentes de cultivo (Figuras 28 e 29). A concentração de biomassa da cultura, cultivada em regime de batelada, determinada em 9,2 dias de cultivo aumentou 1,8 vezes em relação à concentração de biomassa da amostra coletada após 4 dias de cultivo. As concentrações de biomassa das culturas em regime semicontínuo (imediatamente antes da substituição) não variaram significativamente ($p > 0,05$; teste t). As médias das concentrações de biomassa obtidas para as culturas submetidas a regime semicontínuo com diluições de 10, 20 e 30% foram de $0,87 \pm 0,09$, $0,86 \pm 0,08$ e $0,82 \pm 0,11$ g.L⁻¹, respectivamente.

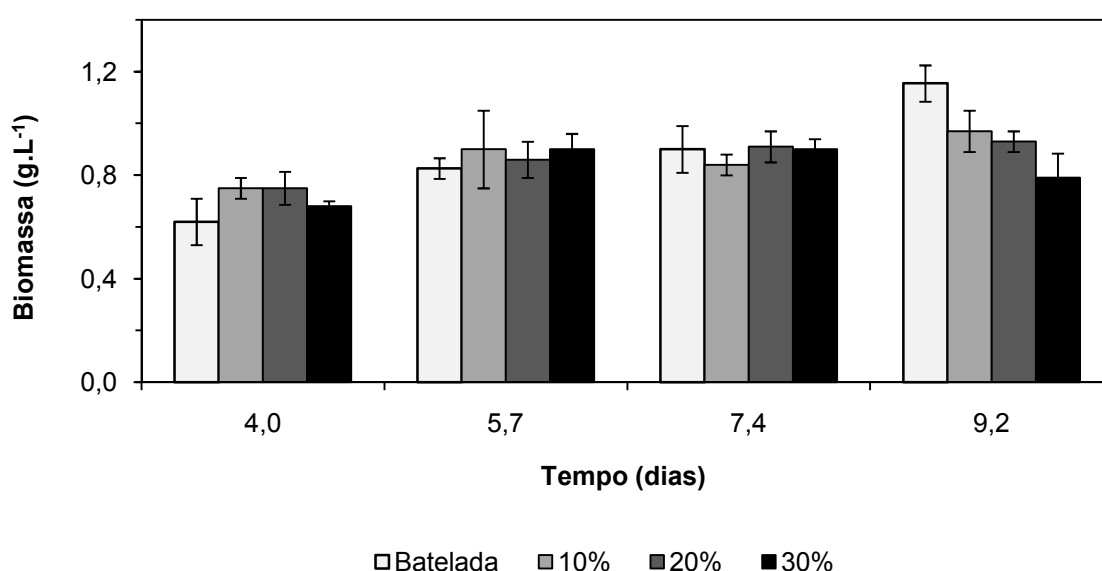


FIGURA 28 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO

As barras verticais representam o erro padrão ($n = 3$) (seção 4.8).

A concentração de lipídeos (Figura 29) da cultura cultivada em regime de batelada, determinada em 9,2 dias de cultivo, aumentou 2,5 vezes em relação à concentração de lipídeos da amostra coletada após 4 dias de cultivo. As concentrações de lipídeos das culturas em regime semicontínuo não variaram significativamente ($p > 0,05$; teste t). As médias das concentrações de lipídeo obtidas para as culturas submetidas a regime semicontínuo com diluições de 10, 20 e 30% foram de $62,1 \pm 7,1$, $64,0 \pm 9,0$ e $57,1 \pm 6,6$ mg.L⁻¹, respectivamente.

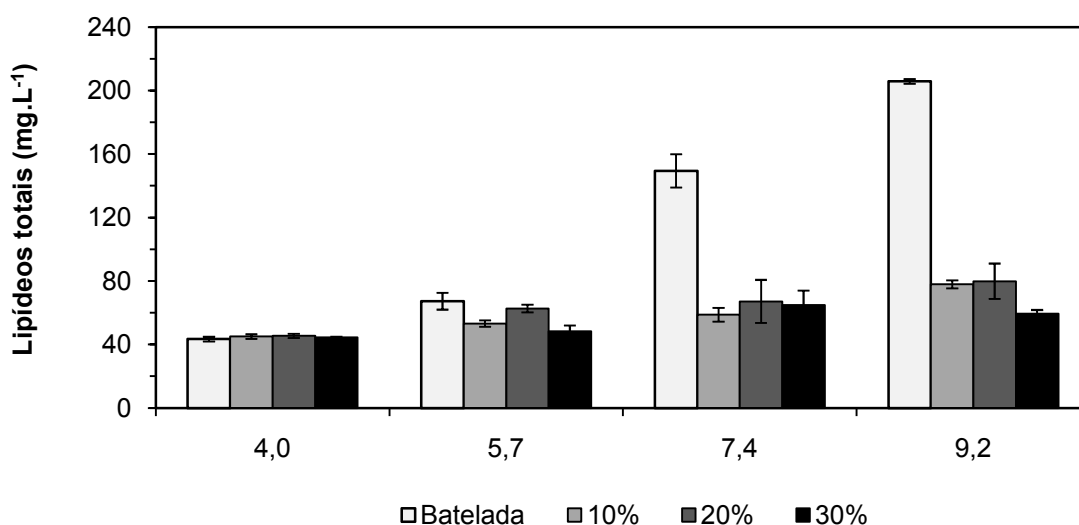


FIGURA 29 - CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA EM DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO

As barras verticais representam o erro padrão (n = 3) (seção 4.8).

Estes resultados mostram que o intervalo de tempo utilizado entre as diluições não influenciou significativamente nas concentrações médias de biomassa e de lipídeos durante o período de regime semicontínuo.

A produtividade volumétrica de biomassa e lipídeos da cultura em regime batelada foi determinada em quatro pontos de amostragem (Tabela 13), com o objetivo de determinar a produtividade máxima. A maior produtividade em biomassa foi de $0,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, obtida em 5,7 dias de cultivo, enquanto a maior produtividade em lipídeos foi de $22,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, obtida em 9,2 dias de cultivo.

TABELA 13 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM REGIME DE BATELADA

Tempo (dias)	4,0	5,7	7,4	9,2
$P_B \text{ (g.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$	$0,16 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
$P_L \text{ (mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$	$11,1 \pm 1,4$	$11,8 \pm 1,7$	$20,1 \pm 2,1$	$22,4 \pm 2,3$

P_B : produtividade de biomassa; P_L : produtividade de lipídeos. Os resultados mostrados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão (seção 4.8).

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$; teste t) nas produtividades de biomassa e lipídeos das culturas cultivadas em regime semicontínuo, visto que as taxas médias de diluição (D_{sc}) foram iguais e que os intervalos entre as diluições não influenciaram nas concentrações de biomassa e lipídeos (Tabela 14).

TABELA 14 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DURANTE O ESTADO PSEUDOESTACIONÁRIO DO CULTIVO DA MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* EM REGIME SEMICONTÍNUO

Diluição	10%	20%	30%
$D_{SC} (h^{-1})$	0,014	0,014	0,014
$P_{B(SC)} (g.L^{-1}.d^{-1})$	$0,30 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,04$
$P_{L(SC)} (mg.L^{-1}.d^{-1})$	$21,1 \pm 2,4$	$21,8 \pm 3,0$	$19,4 \pm 2,2$

Os resultados mostrados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão (seção 4.8). D_{SC} : taxa de diluição média do regime semicontínuo; $P_{B(SC)}$: produtividade de biomassa durante o regime semicontínuo; $P_{L(SC)}$: produtividade de lipídeos durante o regime semicontínuo. Os resultados mostrados são referentes à média de três análises seguida do erro padrão (seção 4.8).

A produtividade média de biomassa obtida no regime semicontínuo foi 1,8 vezes maior do que a produtividade máxima obtida no regime de batelada. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre a média da produtividade de lipídeos no regime semicontínuo ($20,6 \pm 1,2 \text{ mg.L}^{-1}.d^{-1}$) e a produtividade máxima em regime de batelada ($22,4 \pm 2,3 \text{ mg.L}^{-1}.d^{-1}$). Isso ocorreu porque o início das diluições foi feito no final da fase de crescimento estacionário, onde a produtividade de lipídeos foi baixa. Assim, é importante dar continuidade a este estudo, para verificar qual seria o dia do início do regime semicontínuo que resultaria em maior rendimento lipídico sem prejudicar o crescimento celular. Uma outra possibilidade de aumentar a produtividade de lipídeos seria armazenar as culturas coletadas do regime semicontínuo em um tanque para manter as células em crescimento e aumentar a proporção de lipídeos.

6 CONCLUSÕES

Como conclusões alcançadas após a realização deste trabalho destacam-se:

- a partir da avaliação de diferentes metodologias de extração de lipídeos utilizando duas espécies de microalgas (*Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*), concluiu-se que os melhores resultados foram alcançados utilizando o método de Bligh e Dyer modificado combinado a biomassa originada pela microalga *P. tricornutum*;
- o estudo de diferentes formas de processamento da biomassa algal foi avaliado em função do uso de floculação e lavagem da biomassa. Levando em consideração simplicidade e baixo custo, e que não houve diferenças significativas no teor lipídico resultante, concluiu-se que o uso do floculante NaOH e da não utilização de solução de lavagem foi o processamento mais adequado;
- na avaliação do cultivo da microalga selecionada em um minifotobiorreator não foram alcançadas condições ideais para obtenção de biomassa. Deste modo, foram realizadas avaliações do efeito da bomba sobre a viabilidade celular onde se constatou o efeito nocivo causado durante o bombeamento. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que dentre as bombas testadas, a que ocasionou menor cisalhamento celular foi uma eletrobomba com rotor semi-aberto de material plástico.
- o cultivo em regime de batelada foi avaliado em relação à concentração inicial de inóculo e fotoperíodo. As melhores condições encontradas foram: concentração de inóculo na faixa de 30×10^4 até 50×10^4 (células.mL⁻¹) e fotoperíodo de 24 h.
- para o regime de cultivo semicontínuo foram aplicadas as condições iniciais (inóculo e fotoperíodo) delineadas no regime de batelada, sendo ao mesmo introduzida uma taxa de diluição de $0,014 \text{ h}^{-1}$. De acordo com a comparação dos resultados obtidos, concluiu-se que o cultivo em regime semicontínuo mostra-se como o mais eficiente na obtenção de biomassa.

REFERÊNCIAS

ALGAGEN. Disponível em: <http://www.algagen.com/pt/index_Pt.htm>. Acesso em 20/09/2008.

ALGATECH. Disponível em: <<http://www.algatech.com/>>. Acesso em 20/09/2008.

ALIÁS, C. B.; LÓPEZ, M. C. G. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F.; SÁNCHEZ, J. L. G.; GRIMA, E. M. Influence of Power supply in the feasibility of *Phaeodactylum tricornutum* cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, p. 723-733, 2004.

ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 10/10/2009.

BAN-WEISS, G. A.; CHEN, J. Y.; BUCHHOLZ, B. A.; DIBBLE, R. W. A numerical investigation into the anomalous slight NO_x increase when burning biodiesel; A new (old) theory. **Fuel Processing Technology**, v. 88, p. 659-667, 2007.

BEAM (Biotechnological and Environmental Applications of Microalgae). Disponível em: <<http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-Appl4a.html>>. Acesso em 20/10/2008.

BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BORGES, L. V. **Caracterização do potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para a geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2005.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.

BRASIL. Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 142, n. 10, p. 52, 14 jan. 2005. Seção 1.

BRASIL. Resolução ANP n. 7, de 19 de março de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2008.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biodiesel from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** (2009), doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.

CAMACHO, F. G.; GOMEZ, A. C.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 164–172, 1999.

CARTONI, C. R. **Avaliação de catalisadores alcalinos na produção de biodiesel metílico derivado de óleo de soja: análise técnica, econômica e ambiental**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Federal de São Paulo. Lorena, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 126-131, 2008.

CHIU, SHENG-YI; KAO, CHIEN-YA; CHEN, CHIUN-HSUN; KUAN, TANG-CHING; ONG, SEON-CHIN; LIN, CHIH-SHENG. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3389-3396, 2008.

CHIU, SHENG-YI; KAO, CHIEN-YA; TSAI, MING-TA; ONG, SEON-CHIN; CHEN, CHIUN-HSUN; LIN, CHIH-SHENG. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 833-838, 2009.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.

CYANOTECH. Disponível em: < <http://www.cyanotech.com/company.html>>. Acesso em 20/09/2008.

DANCOR. **Centrífuga de aplicações múltiplas**. 2009. Catálogo de produtos.

DANTAS, H. J. **Estudo termoanalítico cinético e reológico de biodiesel derivado do óleo de algodão (*Gossypium hisutum*)**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2006.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. 158 f. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.

DURMAZ, Y. Vitamin E (α – tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. **Aquaculture**, v. 272, p. 717-722, 2007.

EARTHRISE. Disponível em: <<http://www.earthrise.com/home.asp>>. Acesso em 20/09/2008.

EMDADI, D.; BERLAND, B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, v. 26, p. 215-225, 1989.

EPE (Empresa de Pesquisa Energética). **Balanco Energético Nacional 2009** – Ano base 2008: Resultados Preliminares. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br>>. Acesso em: 18/09/2009.

FÁBREGAS, J.; PATINO, J.; MORALES E. D.; CORDERO, B.; OTERO, A. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 266-268, 1996.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. Aquatic Photosynthesis. **Blackwater Science**, Malden, 375 p., 1997.

FERNÁNDEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; PÉREZ, J. A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures. Effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, p.605-611, 1998.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1956.

FUENTES, M. M. R.; PÉREZ, A. N.; MIRAS, J. J. R.; GUERRERO, J. L. G. Biomass nutrient profiles of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of food biochemistry**, v. 25, p. 57-76, 2001.

GIA. Disponível em: <<http://www.gia.org.br>>. Acesso em 20/09/2008.

GONZÁLES, I. M. J.; MEDINA, R. A.; GRIMA, M. E.; GIMÉNEZ, G. A., CARTENS, M.; CERDÁN, E. L. Optimization of fatty acid extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, p.1735-1740, 1998.

GRIMA, E. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231-248, 1999.

GRIMA, E. M.; FERNÁNDEZ, J.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 113-131, 2001.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

GUDIN, C.; CHAUMONT, D.; Cell fragility – The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 38, p. 145-151, 1991.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. In: Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum Publishing, New York, p. 29-60, 1975.

GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. Cambridge University Press: 1984. p. 290-311.

HORIUCHI, J.; OHBA, I.; TADA, K.; KOBAYASHI, M.; KANNO, T.; KISHIMOTO, M. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.95, p. 412-415, 2003.

IHA, O. K.; SUAREZ, A. Z. Composição e análise físico-químicas das diversas oleaginosas para a produção de combustíveis. Disponível em: <<http://vsites.unb.br/iq/pg/resumo/osvaldo.pdf>>. Acesso em Outubro de 2009.

JAMES, C. M.; AL-HINTY, S.; SALMAN, A. E. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. **Aquaculture**, v. 77, p. 337-351, 1989.

KHALIL, C. N. **As tecnologias de produção de biodiesel**. O Futuro da Indústria: Biodiesel. Coletânea de artigos. Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior. Brasília, 2006.

LEE, HO-SANG; SEO, MUN-WON; KIM, Z-HUN; LEE, CHOUL-GYUN. Determining the best specific light uptake rates for the lumostatic cultures in bubble column photobioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.447-452, 2006.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVÍN, P. L.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, p. 17-32, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2009.

MEINERZ, L. I. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2007.

MELO, J. C. de. **Otimização da Produção de Biodiesel**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007.

METTING, F. B., Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.477-489, 1996.

MME (Ministério de Minas e energia). **Boletim Mensal de Combustíveis Renováveis** – n. 24, dezembro de 2009. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes>>. Acesso em: 15/01/2010.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 129, p. 439-445, 2007.

MORTENSEN, K. Y. B.; RAINUZZO, J. K.; KNUTSEN, G. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 122, p. 173-185, 1988.

MURAKAMI, R.; HASHIMOTO, H. Unusual nuclear division in *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae, Heterokonta) wich may ensure faithful transmission of secondary plastids. **Protist**, v. 160, p. 41-49, 2009.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. da C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, p. 7-18, 2008.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p.459-466, 2003.

OLIVEIRA, M. A. C. L.; MONTEIRO, M. P. C.; ROBBS, P. G.; LEITE, S. G. F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquaculture Internacional**, v. 7, p. 261-275, 2004.

OTERO, A.; DOMÍNGUEZ, A.; LAMELA, T.; GARCIA, D.; FÁBREGAS, J. Steady-states semicontinuous cultures of a marine diatom: Effect of saturating nutrient concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 227, p. 23-34, 1998.

OTERO, A.; FÁBREGAS, J. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. **Aquaculture**, v. 159, p. 111-123, 1997.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado**. Fortaleza, Ceará, 2003.

PENTEADO, D. M. R.; SOARES, D.; MITCHELL, D. A.; NOSEDA, M. D.; NDJAYE, P. M.; BECKER, A. Influência da privação do nitrogênio no meio de cultura para o aumento da produção de lipídeos pela *Phaeodactylum tricornutum*. In: IX SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá.

PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DE BIODIESEL (PNPB). Disponível em: < <http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>>. Acesso em: 18/09/2009.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 287-293, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RCC - ROSCOFF CULTURE COLLECTION. Station Biologique de Roscoff – Plankton Group. Disponível em: < <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC>>. Acesso em 20/03/2009.

REIREZ, M. J. F.; CAMACHO, A. P.; FERREIRO, M. J. BLANCO, J.; PLANAS, M.; CAMPOS, M. J.; LABARTA, U. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, p. 17-37, 1989.

REITAN, KI; RAINUZZO, JR; OLSEN, Y. Effect of nutrient limitation on fatty-acid and lipid-content of marine microalgae. **Journal of Phycology**, v. 30, p. 972-979, 1994.

RENAUD, S. M.; ZHOU, H. C.; PARRY, D. L.; THINH, L. V.; WOO, K. C. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis sp.*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis sp.* (clone T.ISO). **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 595-602, 2004.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture. **Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing, Oxford, 566 p., 2004.

RICHMOND, A.; GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. **Biomass**, v. 10, p. 253-264, 1986.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2009.

ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L.; BETENBAUGH, M. J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 430-436, 2008.

RUBIO, F. C.; CAMACHO, F. G.; SEVILLA, J. M. F.; CHISTI, Y.; GRIMA, E. M. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, p. 459-473, 2003.

SCHNEIDER Motobombas. **Bombas centrífugas monoestágio**. 2009. Catálogo de produtos.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, Y. T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **A look back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae**. U.S. Report NREL/TP-580-24190. Golden CO: National Renewable Energy Laboratory, 323 p. Colorado, 1998.

SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel, **Chinese journal of biotechnology**, v. 24, p. 341-348, 2008.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J. ; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

SUH, I. S.; LEE, C.G. Photobioreactor Engineering: Design and Performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 313-321, 2003.

TECHNOLOGY. Disponível em: <<http://www.technology.am/mit-algae-photo-bioreactor-112420.html>>. Acesso em 20/09/2008.

TEIXEIRA, C. M., MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: I CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: Hotel Mercure.

THOMPSON, P. A.; GUO, MING-XIN; HARRISON, P. J. Effects of variation in temperature: On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 481-488, 1992a.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4021-4028, 2008.

UTEX – The Culture Collection of Algae. Disponível em:
<<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>>. Acesso em 20/03/2009.

VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. In: VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomassa microalgale**. México, Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR): 2007. p. 17-25.

VISCARDI, F. A. P. D. Análise de viabilidade técnica e econômica do biodiesel no Brasil. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE P & D EM PETRÓLEO E GÁS, 2005, Salvador. **Anais...** Salvador: Pestana Bahia Hotel.

VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina biomass*: effects of environmental factors and population density. **Biomass**, v. 2, p. 175-185, 1982.

WIKFORS, G. H. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. **Aquaculture**, v. 59, p. 1-14, 1986.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.189-194, 1997.

ZITTELLI, G. C.; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, L.; VINCENZINI, M.; TREDICI, M. R. Production of eicosapentanoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 299-312, 1999.

ZHUKOVA, N. V.; AIZDAICHER, N. A. **Phytochemistry**, v. 39, p. 351-356, 1995.

